

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification⁷: C07K 14/00	A2	(11) International publication number: WO 00/49039 (43) International publication date: 24 August 2000 (24.08.00)
(21) International application number: PCT/EP00/00978 (22) International filing date: 8 February 2000 (08.02.00) (30) Data relating to the priority: 199 06 920.4 19 February 1999 (19.02.99) DE (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): LINXWEILER, Winfried [DE/DE]; Bahnhofstrasse 48, D-64823 Gross-Umstadt (DE). BURGER, Christa [DE/DE]; Carsonweg 23, D-64289 Darmstadt (DE). PÖSCHKE, Oliver [DE/DE]; Paracelsusweg 7, D-65203 Weisbaden (DE). HOFMANN, Uwe [DE/DE]; Hähnleinerstr. 42, D-64665 Alsbach (DE). WOLF, Andrea [DE/DE]; Lahrer Str. 15a, D-68239 Mannheim (DE). (74) Joint Representative: MERCK PATENT GMBH; D- 64271 Darmstadt (DE).	(81) Designated states: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>Without the International Search Report and to be republished once the report has been received.</i>	
As printed		
(54) Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE FUSION PROTEINS AND THEIR UTILIZATION IN EXPRESSION SYSTEMS (54) Bezeichnung: GLUCOSE-DEHYDROGENASE-FUSIONSPROTEINE UND IHRE VERWENDUNG IN EXPRESSIONSSYSTEMEN (57) Abstract The invention relates to novel recombinant fusion proteins containing a protein sequence having the biological activity of glucose dehydrogenase as one of its constituents and to their utilization for simple and efficient detection of any type of proteins/polypeptides in SDS-Page gels and for quick optimization of expression systems that can express the above-mentioned proteins/polypeptides. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft neue rekombinante Fusionsproteine, welche als ein Bestandteil eine Proteinsequenz mit der biologischen Aktivität von Glucose-Dehydrogenase enthalten sowie ihre Verwendung zum einfachen und effizienten Nachweis von beliebigen Proteinen/Polypeptiden in SDS-PAGE-Gelen und zur raschen Optimierung von Expressionssystemen, welche besagte Proteine/Polypeptide zu exprimieren in der Lage sind.		

Glucose-Dehydrogenase-Fusionsproteine und ihre Verwendung in Expressionssystemen

Die Erfindung betrifft neue rekombinante Fusionsproteine, welche als ein Bestandteil eine Proteinsequenz mit der biologischen Aktivität von Glucose-Dehydrogenase (GlcDH) enthalten sowie ihre Verwendung zum einfachen und effizienten Nachweis von beliebigen, vorzugsweise als Fusionspartner dienenden Proteinen / Polypeptiden bzw. zur raschen Optimierung von Expressionssystemen, welche besagte Proteine / Polypeptide zu exprimieren in der Lage sind.

Dabei übernimmt die GlcDH, bzw. die Sequenz, die die biologische Aktivität von GlcDH aufweist, die Rolle eines Marker- bzw. Detektorproteins. Dieses Enzym besitzt als Besonderheit eine außerordentliche Stabilität gegenüber denaturierenden Agenzien wie SDS. GlcDH als Marker- bzw. Detektorprotein zeigt selbst nach den reduzierenden und denaturierenden Bedingungen von SDS-PAGE-Gelen eine unverminderte enzymatische Aktivität. Fusionsproteine, die GlcDH enthalten, sind daher mit einer auf diesem überraschenden Verhalten beruhenden sensitiven enzymatischen Reaktion nachzuweisen. Durch Markierung mit GlcDH kann somit auch schnell, billig und effektiv das gewünschte exprimierte Protein nachgewiesen werden.

Darüber hinaus können in einer Reihe von Fällen insbesondere in *E. coli* (GlcDH-Protein/Polypeptid-Fusionsproteine, , in höherer Ausbeute und Stabilität exprimiert werden, als ohne GlcDH. Entsprechende Fusionsproteine können somit per se zur Gewinnung und Herstellung von Proteinen / Polypeptiden dienen.

Die *in vivo* Expression von rekombinanten Proteinen spielt eine immer größer werdende Rolle in der Biotechnologie. Die Fähigkeit, klonierte Genprodukte aus pro- und eukaryontischen Expressionssystemen wie beispielsweise Bakterien-, Hefe-, Insekten- oder Säugetierzellen, zu erhalten, aufzureinigen und nachzuweisen, wird häufig auch für Studien der Proteinstruktur und -funktion, von Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen sowie Antikörperproduktion und Mutagen-

nese verwendet. Mit Hilfe der DNA-Rekombinationstechnik ist es möglich, natürliche Proteine gezielt zu verändern, so daß ihre Funktion verbessert oder variiert wird. Die rekombinanten Proteine werden in ständig weiterentwickelten Expressionssystemen synthetisiert, deren Optimierung an den verschiedensten Stellen im System stattfinden kann.

Der gesamte Prozeß der rekombinanten Proteinsynthese ist in zwei Abschnitte aufteilbar. In einem ersten Schritt findet die molekularbiologische Genisolierung und Expression des Zielproteins statt und im darauffolgenden Schritt der Nachweis und die Aufreinigung aus den rekombinanten Zellen oder ihrem Wachstumsmedium. Auf molekularer Ebene wird das Gen eines Proteins in einen dafür vorgesehenen Expressionsvektor kloniert, anschließend in eine Wirtszelle (Pro- oder Eukaryonten-Zelle) eingeschleust und dort exprimiert. Bakterienzellen erweisen sich dabei als einfache und kostengünstige Systeme, die hohe Ausbeuten liefern. Am häufigsten wird das gramnegative Bakterium *E. coli* als Wirtszelle eingesetzt.

Ziel bei der Expression von Fremdgenen in *E. coli* ist die Gewinnung einer möglichst großen Menge an biologisch aktiven, rekombinanten Proteinen, die sogenannte Überexpression. Bekannt ist, daß eukaryontische Fremdproteine ihre biologische Aktivität dabei durch Aggregation, als Einschlußkörperchen, durch inkorrekte Faltung oder proteolytischen Abbau verlieren können. Eine Möglichkeit, diese häufig auftretenden Schwierigkeiten zu vermeiden, bietet die Ausschleusung der exprimierten Proteine als Sekretionsproteine aus der Zelle oder aber die Verwendung sogenannter Fusionsproteine, durch die unlösliche rekombinante Proteine in der Zelle in löslicher Form vorliegen können.

Um die Funktion von Proteinen sowie ihre für die Funktion wichtigen Interaktionspartner zu untersuchen, werden Proteine meistens in eukaryontischen Zellen exprimiert. Dort können die für die Funktion wichtigen posttranskriptionalen Modifikationen und die richtige Kompartimentierung erfolgen. Außerdem sind andere für die korrekte Faltung und Prozessierung wichtige Proteine vorhanden.

Auch bei der Expression von größeren Proteinen und von Proteinen, die post-transkriptionale Modifikationen wie etwa S-S Brückenbildung, Glykosylierung, Phosphorylierung usw. für die korrekte Faltung benötigen bieten sich eukaryontische Expressionssysteme an. Da diese Systeme in der Regel aufwendig und
5 teuer sind und die Expressionsrate unter der von E.coli liegt, ist es besonders wichtig, ein Nachweissystem zu haben, das schnell, sicher, sensitiv und preiswert ist.

Für den Nachweis von rekombinant gebildeten Fremdproteinen, deren biologische Funktion nicht bekannt ist, existieren zahlreiche Gen-Fusions-Systeme.
10 Darin wird das exprimierte Fusionsprotein über den funktionell bekannten Fusionsproteinanteil nachgewiesen.

Ein empfindliches Nachweissystem ist nötig, um die korrekte Expressierung, die
15 exprimierter Menge, das Molekulargewicht und die funktionelle Aktivität des gebildeten Fusionsproteins zu bestimmen. Die Zahl der funktionell unbekannten Proteine nimmt immer rascher zu und es wird immer wichtiger, dafür schnelle und kostengünstige Nachweissysteme zu entwickeln. Bei den meisten Gen-Fusions-Systemen werden immunologische Verfahren wie z. B. der "enzym-linked-immuno-sorbent-assay" (ELISA) oder der Western-Blot eingesetzt, bei denen
20 rekombinant gebildete Fusionsproteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Entsprechende Fusionsproteine haben aber nicht nur den beschriebenen Vorteil,
25 daß das Fremdprotein indirekt leicht nachgewiesen und analysiert werden kann, sondern sie ermöglichen vielfach, das gewünschte Protein in höheren Ausbeuten zu exprimieren, als es ohne seinen Fusionspartner der Fall wäre. Jeder Fusionspartner hat in einem bestimmten Expressionssystem Vorteile, die er auf den anderen Partner nicht selten zu übertragen in der Lage ist. So kann beispielsweise
30 die Empfindlichkeit mancher Proteine gegenüber proteolytischem Abbau verringert werden, wenn es als Fusionsprotein vorliegt. Auch weisen Fusionsproteine häufig günstigere Löslichkeits- und Sekretionseigenschaften auf als die einzelnen Komponenten.

Es gibt daher zahlreiche Gründe Genfusionen für die Expression rekombinanter Proteine in heterologen Wirten durchzuführen. Diese sind: Erhöhung der Löslichkeit von Fremdproteinen, Erhöhung der Stabilität von löslichen Fremdproteinen, Lokalisation des Fremdproteins in einem spezifischen Zellabschnitt, schnelle Gewinnung von Fremdproteinen durch vereinfachte Reinigungsstrategien, Möglichkeit der spezifischen Abspaltung des Fusionsproteins, schnelle Nachweismöglichkeit des Fremdproteins aus unaufgereinigten Zellextrakten.

Zur Zeit existieren viele Funktionstests zur Expressionstestung rekombinanter Proteine mit Hilfe von Gen-Fusions-Systemen. Hierbei handelt es sich um einfache Tests, die meist den direkten Nachweis aus ungereinigten Zellextrakten ermöglichen. Die Testsysteme unterscheiden sich jedoch erheblich in Zeitaufwand, Durchsatz und Sensitivität.

Für die oben genannten Zwecke können zwei Arten von Fusionsproteinen unterschieden werden. Zum einen Fusionsproteine, die aus dem gewünschten Protein und einem meist kurzen Oligopeptid bestehen. Dieses Oligopeptid ("Tag") hat die Aufgabe einer Marker- oder Erkennungssequenz für das gewünschte Protein. Zusätzlich kann ein Tag die Reinigung vereinfachen.

Die Hauptanwendung des Tag besteht einmal im Testen der Expression, zum anderen bei der Proteinreinigung. Ein Beispiel hierfür ist der sogenannte His-Tag, der aus einer Peptidsequenz mit sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Resten besteht, die direkt mit dem rekombinanten Protein verknüpft ist. Mit Hilfe des angehängten His-Restes kann das Fusionsprotein leicht über eine Metall-Affinitätssäule gereinigt werden (Smith et al., 1988). Eine einfache Detektierung dieses His-Tags findet mit Hilfe des hoch spezifischen monoklonalen Antikörpers His-1 statt (Pogge v. Strandmann et al., 1995). Ein weiterer in Fusionsproteinen verwendeter Marker ist das GFP, ein aus der Qualle *Aequorea victoria* stammendes "green fluorescent protein" (GFP), das als Biolumineszenz-Protein in diversen biotechnologischen Anwendungen eingesetzt wird (Kendall und Badminton, 1998; Chalfie et al., 1994; Inouye et al., 1994). Es kann durch seine Autofluores-

zenz einfach detektiert werden in lebenden Zellen, Gelen und sogar lebenden Tieren.

Weitere Beispiele für Tags, die nicht näher erläutert werden sollen, sind das
5 Strep-Tag-System (Uhlén et al., 1990) oder das myc-Epitop-Tag (Pitzurra et al., 1990).

Die Hauptanwendung von Fusionsproteinen, die aus einem rekombinanten Protein und einem **funktionell aktiven Protein** bestehen, liegt neben dem oben be-
10 schriebenem Nachweis in der vereinfachten Reinigung der exprimierten Fusionsproteine. Verschiedene Systeme sind hierunter bekannt, von denen einige nachfolgend kurz erwähnt werden sollen.

Im GST-System ermöglichen Fusionsvektoren die Expression von kompletten
15 Genen oder Genfragmenten in Fusion mit Glutathion-S-transferase. Durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose kann das GST-Fusionsprotein leicht aus den Zelllysaten aufgereinigt werden (Smith, Johnson, 1988). Es ist ein biochemischer und ein immunologischer Nachweis verfügbar. Im MBP-System ist das Maltose bindende Protein (maltose-binding protein, MBP) ein periplasmatisches Protein aus *E.coli*, das am Transport von Maltose und Maltodextrinen
20 durch die Bakterienmembran beteiligt ist (Kellermann et al., 1982). Es wurde vor allem für Expression und Reinigung von alkalischer Phosphatase an einer quervernetzten Amylose-Säule verwendet. Das Intein-System ist speziell für die schnelle Aufreinigung eines Target-Proteins geeignet. Das Inteingen besitzt die
25 Sequenz für die Intein-Chitin Bindungs Domäne (CBD), wodurch das Fusionsprotein direkt aus dem Zellextrakt an eine Chitinsäule gebunden und damit aufgereinigt werden kann (Chong et al., 1997).

Glucose-Dehydrogenase (GlcDH) ist ein Schlüsselenzym während der frühen
30 Phase der Sporenbildung bei *Bacillus megaterium* (Jany et al., 1984). Es katalysiert spezifisch die Oxidation von β -D-Glucose zu D-Gluconolacton, wobei NAD⁺ bzw. NADP⁺ als Coenzym fungieren. Außer in Bakteriensporen, kommt das Enzym auch in der Säugetierleber vor. Es existieren in *B. megaterium* M1286 zwei

voneinander unabhängige Glucose-Dehydrogenase-Gene (gdh) (Heilmann et al., 1988). GdhA und gdhB unterscheiden sich in ihrer Nucleotid-Sequenz erheblich, wogegen GlcDH-A und GlcDH-B trotz unterschiedlicher Proteinsequenz annähernd die gleiche Substratspezifität besitzen. Weitere Angaben sowie die entsprechenden DNA- und Aminosäuresequenzen sind auch z. B. der
5 EP-B-0290 768 zu entnehmen.

Die oben beschriebenen Systeme für den Nachweis von rekombinant gebildeten Fremdproteinen, deren biologische Funktion entweder nicht oder nur unzurei-
10 chend bekannt ist, sind meist kompliziert und zeitaufwendig. Dadurch ist die Verbesserung und Optimierung der Expressionsbedingungen oft nicht schnell oder einfach genug möglich.

Deshalb stellt es einen großen Fortschritt dar, einen Fusionsproteinpartner ent-
15 wickelt zu haben, der einen schnelleren Nachweis des Fusionsproteins ermöglicht, bzw. die im Stand der Technik beschriebenen Nachteile vergleichbarer Systeme nicht aufweist.

Es wurde nun gefunden, daß Fusionsproteine, die GlcDH oder eine Sequenz,
20 welche die biologische Aktivität von GlcDH aufweisen, hervorragend geeignet sind, um ein beliebiges gewünschtes "Fremd- oder Zielprotein" rascher, einfacher und damit effizienter nachzuweisen als mit dem beschriebenen Stand der Technik. Diese Eigenschaft beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß GlcDH seine enzymatische Aktivität unter Bedingungen, unter denen andere Enzyme
25 inaktiviert werden (z. B. bei SDS-PAGE), behält.

Bekannt ist die Möglichkeit, Dehydrogenasen aufzureinigen über immobilisierte Farbstoffe wie Cibachron Blue 3 G oder andere NAD analoge Verbindungen wie Amino-
30 hexyl-AMP, welche durch ihre Struktur dem Coenzym NAD⁺ ähnlich sind und gleichfalls an alle Dehydrogenasen binden.

Als Teil eines Fusionsproteins erleichtert deshalb Glucose-Dehydrogenase aufgrund seiner Affinität zu diesen z.B. an einem Gel immobilisierten Farbstoffen, welche kommerziell erhältlich sind, die Aufreinigung des Fusionsproteins in ei-

nem Schritt. Ferner kann GlcDH als Bestandteil eines Fusionsproteins durch die Kopplung der enzymatischen Reaktion an eine sensitive Farbreaktion, vorzugsweise mit Iodphenylnitrophenyl-phenyltetrazolium-Salz (INT) oder Nitroblau-tetrazolium-Salz (NBT) (unter den genannten Bedingungen) nachgewiesen werden, wodurch sich der indirekte Nachweis des Fremdproteins weiter vereinfacht. Die Anfärbungsmethode für GlcDH als Markerenzym hat zudem den Vorteil, daß sie die übliche Anfärbung von Proteinen mit z.B. Coomassie-Farbstoffen oder Silberfärbung im selben Gel nicht behindert.

- 10 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht das Fusionsprotein neben GlcDH und dem Fremdprotein noch zusätzlich aus einem Tag-Peptid, welches für zusätzliche Charakterisierungen der an das Tag-Peptid gebundenen Proteine verwendet werden kann. Die Charakterisierung erfolgt zum Beispiel über den Polyhistidin-Tag, der von spezifischen Antikörpern als Antigen erkannt wird.
- 15 Der Nachweis des entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt dann beispielsweise mit Hilfe eines Peroxidase (POD)-markierten Antikörpers nach an sich bekannten Methoden. Durch die gebundene Peroxidase entsteht nach Zugabe eines entsprechenden Substrats (z.B. ECL-System, Western Exposure Chemiluminescent Detektion System, Fa. Amersham) ein chemilumineszierendes
- 20 Produkt, das mit einem hierfür geeigneten Film detektiert werden kann. Der immunologische Nachweis kann aber auch nach an sich bekannter Technik durch ein spezielles Antikörper-Tag, z. B. dem myc-Tag, erfolgen. Der Polyhistidin-Tag, allein oder in Kombination mit dem myc-Tag, hat überdies den Vorteil, daß das Fusionsprotein durch Bindung an einer Metall-Chelatsäule aufgereinigt werden
- 25 kann.

Das GlcDH-Fusionsprotein kann aber auch direkt an einen spezifischen anti-GlcDH-Antikörper, der z.B. auf einem Chromatographiegel wie Agarose immobilisiert wurde, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt bzw. isoliert werden.

30

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist, daß GlcDH vorzugsweise in E. coli durch die bekannten Expressionssysteme (s. oben) in hohen Ausbeuten in löslicher Form exprimiert werden kann. So wurde rekombinante Glucose-Dehydrogenase

aus *Bacillus megaterium* M1286 erfolgreich in *E. coli* mit hoher enzymatischer Aktivität exprimiert (Heilmann 1988). Die Expression anderer eukaryontischer Gene in *E. coli* ist oft durch die Instabilität der Polypeptidkette im bakteriellen Wirt begrenzt. Eine inkorrekte Faltung kann zu Aggregation ("inclusion bodies"), verminderter oder fehlender biologischen Aktivität und proteolytischen Abbau führen.
5 Ein entsprechendes Fusionsgen, bei dem das GlcDH-Gen oder ein Fragment mit biologischer Aktivität von GlcDH an das Gen des gewünschten Fremdproteins ligiert wurde, kann nun erfindungsgemäß mit nahezu unveränderter Expressionsrate und Ausbeute, verglichen mit dem GlcDH-Gen ohne Fusionspartner, zum
10 Fusionsprotein umgesetzt werden. Dies kann auch dann erfolgen, wenn das Fremdprotein allein an sich nicht oder nur in verminderten Ausbeuten oder nur in inkorrekt gefaltetem Zustand oder nur unter Anwendungen zusätzlicher Techniken exprimiert werden kann. Durch anschließende Abspaltung des Markerproteins GlcDH bzw. des Zielproteins beispielsweise mit Endoproteasen kann somit
15 das gewünschte Fremdprotein erhalten werden.

Als Beispiel für ein Zielprotein, welches als Fusionsprotein zusammen mit GlcDH erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden kann, dient erfindungsgemäß Tridegin. Tridegin ist ein extrem wirksamer Peptid-Inhibitor für den Blutgerinnungsfaktor
20 XIIIa und stammt aus dem Blutegel *Haementeria ghilianii* (66 AS, 7,6 kD; Finney et al., 1997).

Erfindungsgemäß sind aber keinerlei Einschränkungen in bezug auf die Art und die Eigenschaften des eingesetzten Fremdproteins zu nennen.

25

Die Erfindung beschränkt sich nicht nur auf die Expression der erfindungsgemäßen Fusionsproteine in *E. coli*. Vielmehr können derartige Proteine auch vorteilhaft mittels an sich bekannter Methoden und entsprechender stabiler Vektorkonstruktionen (z. B. mit Hilfe des humanen Cytomegalovirus (CMV)-Promotors) in
30 Säuger-, Hefe- oder Insektenzellen mit guten Expressionsraten synthetisiert werden.

Aus dem oben beschriebenen kann die Erfindung demnach wie folgt, bzw. wie in den Patentansprüchen angegeben, zusammenfassend charakterisiert werden:

Gegenstand der Erfindung ist somit ein rekombinantes Fusionsprotein, bestehend aus mindestens einer ersten und zweiten Aminosäuresequenz, wobei die erste Sequenz die biologische Aktivität von Glucose-Dehydrogenase aufweist. Gegenstand der Erfindung ist insbesondere ein entsprechendes rekombinantes Fusionsprotein, bei dem die besagte zweite Sequenz ein beliebiges rekombinantes Protein / Polypeptid X ist oder Teile davon darstellt.

Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine können zusätzlich Erkennungssequenzen, insbesondere Tag-Sequenzen enthalten. Gegenstand der Erfindung ist somit ferner ein entsprechendes Fusionsprotein, welches zusätzlich mindestens eine weitere für die Detektion geeignete Erkennungssequenz oder Tag-Sequenz aufweisen kann.

Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine können verschiedenartig eingesetzt werden. Dabei spielt die Glucose-Dehydrogenase mit ihren Eigenschaften die entscheidende Rolle. So ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung von Glucose-Dehydrogenase als Detektorprotein für ein beliebiges rekombinantes Protein / Polypeptid X in einem der besagten Fusionsproteine. Weiter ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung von Glucose-Dehydrogenase in einem Nachweis-system für die Expression eines rekombinanten Proteins / Polypeptids X als Bestandteil eines entsprechenden Fusionsproteins. Ferner ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung von GlcDH zum Nachweis für Protein-Protein Interaktionen, wobei ein Partner dem rekombinanten Protein / Polypeptid X, wie oben und unten definiert, entspricht. Schließlich kann GlcDH entsprechend der Erfindung als Detektorprotein für ein beliebiges drittes Protein / Polypeptid dienen, welches nicht Bestandteil des Fusionsproteins ist, aber an die zweite Sequenz des Proteins / Polypeptids X des besagten Fusionsproteins zu binden vermag. Ferner kann GlcDH als Markerprotein von einem Partner in ELISA-Systemen, Western-blot und verwandten Systemen eingesetzt werden.

Die Erfindung umfaßt, da sie rekombinante Techniken einsetzt, natürlich auch entsprechende Vektoren, Wirtszellen und Expressionssysteme. Gegenstand der Erfindung ist neben diesen Vektoren und Wirtszellen als solche auch die Verwendung entsprechender Expressionsvektoren bei der Optimierung der Expression eines rekombinanten Proteins / Polypeptids X in einem rekombinanten Herstellungsverfahren sowie die Verwendung einer entsprechenden Wirtszelle bei der Optimierung der Expression eines rekombinanten Proteins / Polypeptids X in einem solchen Herstellungsverfahren.

- 10 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zum schnellen Nachweis eines beliebigen rekombinanten Proteins / Polypeptids X mittels Gelelektrophorese, insbesondere SDS-PAGE-Gelelektrophorese, wobei ein entsprechendes Fusionsprotein hergestellt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wird und das nachzuweisende rekombinante Protein / Polypeptid im Gel über die Enzymaktivität der
- 15 Glucose-Dehydrogenase sichtbar gemacht wird.

Erfindungsgemäß wird dabei zum Nachweis der Enzymaktivität der Glucose-Dehydrogenase eine Farbreaktion auf Basis von Tetrazoliumsalzen, insbesondere Iodphenylnitrophenyl-phenyltetrazolium-Salz (INT) oder Nitroblau-tetrazolium-Salz (NBT), eingesetzt, wobei sich gegebenenfalls vor oder nach der besagten erfolgten Farbreaktion eine generelle Proteinfärbung gemäß des Standes der Technik anschließen kann.

Im folgenden sind die Abbildungen kurz erklärt:

25

Abb. 1: Konstruktionsschema des Vektors pAW2. Der Vektor enthält die Sequenz für GlcDH. Die vollständige Sequenz ist in Seq. Id. No. 1 dargestellt.

Abb. 2: Konstruktionsschema des Vektors pAW3.

- 30 Abb. 3: Konstruktionsschema des Vektors pAW4. Der Vektor enthält die Sequenz für GlcDH und Tridegin. Die vollständige Sequenz ist in Seq. Id. No. 3 dargestellt.

Abb. 4: Anfärbung von GlcDH auf einem SDS-PAA-Gel. Die Färbemethode ist in den Beispielen näher beschrieben. 1: Rainbow-Marker; 2: 0,1 µg GlcDH; 3: 0,05 µg GlcDH; 4: 0,001 µg GlcDH; 5: Lysat HC11-Zellen; 6: prestained SDS-Marker.

5

Abb. 5: Nachweis des exprimierten GlcDH-Enzyms (15% SDS-PAA-Gel, INT-Färbung); 1: Rainbow-Marker; 2: 0,2 µg native GlcDH; 3: 10 µl Zellextrakt / 1ml Suspension Klon 2, 4: 10 µl Zellextrakt / 1ml Suspension Klon1; 5: pre-stained SDS-Marker; Zellextraktvolumen: 100 µl.

10

Abb. 6: Verdünnungsreihe aus pAW2-Expression (15% SDS-PAA-Gel, INT-Färbung); 1: Rainbow-Marker; 2: 10 µl Zellextrakt / 100 µl Suspension; 3: 10 µl Zellextrakt / 1:5 Verdünnung; 4: 10 µl Zellextrakt / 1:10 Verdünnung; 5: 10 µl Zellextrakt / 1:20 Verdünnung; 6: 0,5 µg GlcDH; 7: Broad-Range SDS-Marker; 8:
15 prestained SDS-Marker; Zellextraktvolumen: 100 µl.

Abb. 7: Nachweis des exprimierten Tridegin/GlcDH-Fusionproteins (10% SDS-PAA-Gel, INT/CBB); 1: Broad-Range SDS-Marker; 2: 1 µg GlcDH; 3: 0,5 µg GlcDH; 4: 0,1 µg GlcDH; 5: 500 µl Zellextrakt; 6: 200 µl Zellextrakt; 7: 100 µl
20 Zellextrakt; 8: 500 µl Zellextrakt (pAW2-Expression); Zellextraktvolumen: 100 µl.

Abb. 8: Immundetektion von Tridegin/His- und Tridegin/His/GlcDH-Fusionsprotein (aus 10% SDS-PAA-Gel, ECL-Detektion) und Vergleich mit Tridegin/His/GlcDH (10% SDS-PAA-Gel, INT-CBB-Färbung); 1: Broad-Range-Marker;
25 2: 1 ml Zellextrakt (pAW2-Expression); 3: 100 µl Zellextrakt (pST106-Expression); 4: 200 µl Zellextrakt (pST106-Expression); 5: 300 µl Zellextrakt (pAW4-Expression); 6: 2,5 µg Calin-His-Positivkontrolle; 7: Broad-Range-Marker; 8: 100 µl (pAW4-Expression); Zellextraktvolumen: 100 µl.

Abb. 9: SDS-Gel, welches die Empfindlichkeit der Detektion von GlcDH
30 verdeutlicht. Aufgetragen sind 1, 5, 10, 25, 50 ng GlcDH sowie Molekulargewichtsmarker (linke Spalte).

Im folgenden sind die oben und unten verwendeten Abkürzungen erläutert

	A	Adenin
	A _x	Absorption bei x nm
	AK	Antikörper
	Amp	Ampicillin
5	AP	Alkalische Phosphatase
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	AS	Aminosäure
	bla	β-Lactamase-Gen
	BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
10	bp	Basenpaare
	BSA	Bovines (Rinder)-Serumalbumin
	C	Cytosin
	cDNA	copy (complementary) DNA
	CBB	Coomassie Brilliant Blue
15	CIP	calf intestinal phosphatase
	dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
	ddNTP	2',3'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
	DMF	Dimethylformamid
	DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
20	DNA	Desoxyribonucleinsäure
	dsDNA	Doppelstrang-DNA
	DTT	Dithiothreitol
	ECL	Exposure TM Chemiluminescence
	EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, Dinatriumsalz
25	ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
	EtBr	Ethidiumbromid
	EtOH	Ethanol
	f. c.	final concentration
	FACS	Fluorescent activated cell sorting
30	G	Guanin
	GFP	Green fluorescent protein
	GlcDH	Glucose-Dehydrogenase (Protein)
	gdh	Glucose-Dehydrogenase (Gen)

	GST	Glutathion-S-Transferase
	His	Histidin-Rest
	HRP	Horseradish peroxidase
	IB	Inclusion Body
5	IgG	Immunglobulin G
	INT	Iodnitrotetrazoliumviolett
	kb	Kilobasenpaare
	kD	KiloDalton
	mA	Milliampere
10	m-RNA	messenger-RNA
	MBP	Maltose-binding protein
	MCS	Multiple cloning site
	M _r	relatives Molekulargewicht
	NAD (P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (-Phosphat), freie Säure
15	Od _x	optische Dichte bei x nm
	ompA	outer membrane protein A
	ori	origin of replication
	PAA	Polyacrylamid
	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
20	PCR	Polymerase Chain Reaction
	POD	Peroxidase
	PVDF	Polyvinylidendifluorid
	RNA	Ribonucleinsäure
	RNAse	Ribonuclease
25	rpm	Umdrehungen pro Minute
	rRNA	ribosomale RNA
	RT	Raumtemperatur
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	ssDNA	Einzelstrang-DNA
30	Strep	Streptavidin
	T	Thymin
	T _m	Schmelzpunkt (DNA-Duplex)
	t-RNA	transfer-RNA

	<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
	TCA	Trichloressigsäure
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
	Tet	Tetracyclin
5	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	U	Unit = Einheit der Enzymaktivität
	U	Uracil
	UV	Ultraviolette Strahlung
	ÜN	Über Nacht
10	V	Volt
	VIS	visible (sichtbarer Bereich)
	w/v	weight per volume

Literaturverzeichnis:

- 15 Aoki et al. (1996), FEBS Letters **384**, 193-197
Banauch et al. (1975), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **13. Jg.**, 101-107
Bertram, & Gassen (1991) Gentechnische Methoden,
Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- 20 Brewer & Sassenfeld (1985), Trends in Biotechnology **3**, No. 5, 119-122
Brown, T. A. (1993) Gentechnologie für Einsteiger: Grundlagen, Methoden, Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford
Casadaban et al. (1990), Methods in Enzymology **100**, 293
Chalfie et al. (1994), Science **263**, 802-805
- 25 Chong, S. et al. (1997), Gene **192**, 271-281
Collins-Racie et al. (1995), Biotechnology **13**, 982-987
Di Guan et al. (1988), Gene **67**, 21-30
Ettinger et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 13102-13107
Finney et al. (1997), Biochem. J. **324**, 797-805
- 30 Gazitt et al. (1992), Journal of Immunological Methods **148**, 159-169
Ghosh et al. (1995), Analytical Biochemistry **225**, 376-378
Goeddel et al. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 106-110
Hafner & Hoff (1984), Genetik. Neubearbeitung, Schrödel-Verlag, Hannover

- Harlow & Lane (1988), A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
- Harris & Angal (1990) Protein purification applications: a practical approach.
Oxford University Press, Oxford; New York; Tokyo
- Heilmann et al. (1988), Eur. J. Biochem. **174**, 485-490
- 5 Hilt et al. (1991), Biochimica et Biophysica Acta **1076**, 298-304
- Ibelgaufits, H. (1990) Gentechnologie von A bis Z. Erweiterte Ausgabe,
VCH-Verlag, Weinheim
- Inouye et al. (1994), FEBS Letters **341**, 277-280
- Itakura et al. (1977). Science **198**, 1056-1063
- 10 Jany et al. (1984), FEBS Letters **165**, no. 1, 6-10
- Kellermann & Ferenci (1982), Methods in Enzymology **90**, 459-463
- Laemmli (1970), Nature **227**, 680-685
- La Vallie & McCoy, (1995), Curr. Opin. Biotechnol. **6**, 501-506
- Makino et al. (1989), Journal of Biological Chemistry **264**, No. 11, 6381-6385
- 15 Marston (1986), Biochem. J. **240**, 1-12
- Moks et al. (1987), Biochemistry **26**, 5239-5244
- Okorokov et al. (1995), Protein Expr. Purif., **6**, 472-480
- Pharmacia Biotech 1: From Cells to Sequences, A Guide to PCR analysis
of nucleic acids
- 20 Pharmacia Biotech 2: The Recombinant Protein Handbook, Principles and Methods
- Pitzurra et al. (1990), Journal of Immunological Methods **135**, 71-75
- Pogge v. Strandmann et al. (1995), Protein Engineering **8**. No.7, 733-735
- Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual 1,
25 Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **74**, 5463-5467
- Schein (1989), Bio/Technology **7**, 1141-1149
- Scopes (1994) Protein purification: principles and practice, 3rd ed.,
Springer-Verlag, New York; Berlin; Heidelberg
- 30 Smith & Johnson (1988), Gene **67**, 31-40
- Smith et al. (1988), Journal of Biological Chemistry **263**, No. 15, 7211-7215
- Uhlén & Moks (1990), Gene Fusions for Purpose of Expression:
An Introduction [12]. Methods in Enzymology **185**, 129-143

Uhlén et al. (1983), Gene **23**, 369

Falls nicht anderweitig dargelegt, entsprechen die bei dieser Erfindung verwendeten Methoden und Techniken hinlänglich bekannten und in der einschlägigen Literatur beschriebenen Methoden und Verfahren. Insbesondere sind die Offenbarungsgehalte der oben genannten Publikationen und Patentanmeldungen, vor allem von Sambrook et al. und Harlow & Lane sowie die EP-B-0290 768 erfindungsgemäß mit umfaßt. Die gemäß der Erfindung verwendeten Plasmide und Wirtszellen sind in der Regel exemplarisch und können im Prinzip durch modifizierte oder anders aufgebaute Vektorkonstruktionen oder andere Wirtszellen ersetzt werden, sofern sie noch die genannten erfindungswesentlichen Bestandteile aufweisen. Die Herstellung solcher Vektorkonstruktionen sowie die Transfektion entsprechender Wirtszellen und die Expression und Aufreinigung der gewünschten Proteine entsprechen weitgehend bekannten Standardtechniken und können erfindungsgemäß ebenfalls innerhalb eines weiten Rahmens modifiziert werden.

Im folgenden wird die Erfindung näher beschrieben. Weitere Details sind in den Beispielen erläutert.

Das *Bacillus megaterium* GlcDH-Strukturgen wurde mittels PCR modifiziert, wobei das Plasmid pJH115 (EP 0290 768) als Template fungierte. Das amplifizierte Fragment (0,8 kb), das an einem Ende eine PstI- und am anderen eine Eco47III-Erkennungssequenz besaß, wurde mit diesen Enzymen verdaut und in den cytoplasmatischen (pRG45) oder periplasmatischen (pST84) *E. coli*-Expressionsvektor kloniert (Abb1, 2). Die resultierenden Plasmide, pAW2 und pAW3, besaßen nun ein GlcDH-Gen, das ein Protein von etwa 30 kD (261 AS) verschlüsselt und unterhalb des starken Tet-Promotors liegt. Der cytoplasmatische pAW2-Expressionsvektor besitzt eine Größe von ca. 4 kb. Der periplasmatische pAW3-Sekretionsvektor ist geringfügig größer und unterscheidet sich von pAW2 nur in einer der multiple-cloning-site (MCS) vorgeschalteten omp A-Signalsequenz, die dazu führt, daß das rekombinante Protein in das Periplasma sezerniert werden kann. Beide Vektoren besitzen zudem eine MCS mit 12 unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen, die in frame-Klonierung mit dem nachfol-

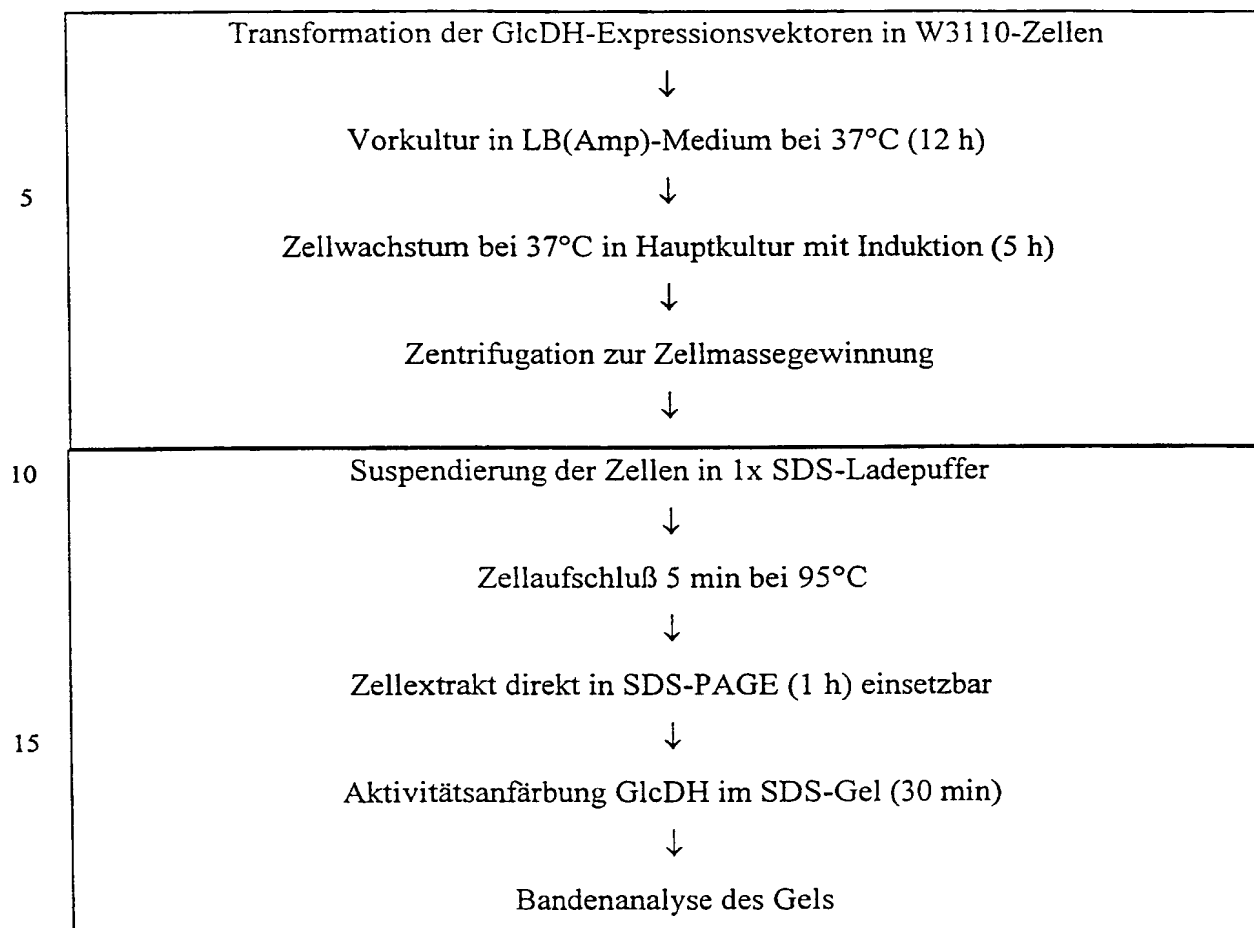
genden His-Tag ermöglichen. Durch den Polyhistidin (6His)-Tag wird die Reinigung des rekombinanten Proteins an einer Metall-Affinitätssäule möglich. Der Vektor pAW4 enthält schließlich das Tridegin-Gen und das GlcDH-Gen, welche über eine MCS miteinander verbunden wurden sowie den Polyhistidin (6 His)-
5 Tag, der stromabwärts mit dem GlcDH-Gen ligiert ist. Die einzelnen Konstruktionen sind in den Abb. 1, 2 und 3 dargestellt. Die gewählten Plasmidkonstruktionen sind aber nur beispielhaft und schränken die Erfindung nicht ein. Sie können durch andere geeignete Konstruktionen, welche die genannten DNA-Sequenzen enthalten, ersetzt werden. Die Herstellung der Vektoren, der Klone und die Ex-
10 pression der Proteine ist in den Beispielen weiter spezifiziert.

Die Empfindlichkeit der Aktivitätsanfärbung wurde im reduzierten SDS-Gel für native GlcDH durchgeführt. Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe mit der nativen GlcDH ($c = 1 \text{ mg/ml}$; $A = 200 \text{ U/ml}$) angefertigt und eine Negativkontrolle vor-
15 bereitet. Nach SDS-PAGE und Aktivitätsanfärbung mittels INT wurde das in Abb. 3 dargestellte SDS-Gel erhalten. Mit Hilfe des eingesetzten Tests konnte die GlcDH bis zu einer Konzentration von 50 ng nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle, in der keine GlcDH vorhanden ist, zeigt wie erwartet keine Bande auf.

20 Mit Hilfe von Markerproteinen läßt sich über eine Eichkurve das genaue Molekulargewicht der nativen GlcDH ermitteln. Hierfür wurden die relativen Laufstrecken der Markerproteine bestimmt und gegen deren zugehöriges logarithmisches Molekulargewicht aufgetragen.

Die durchgeführten Expressionen wurden gemäß dargestellten Schema ausge-
25 führt (Tab. 1):

Tab. 1



Das Plasmid pAW2/Klon9 (pAW2/K9) wurde in den kompetenten *E. coli*-

20 Expressions-stamm W3110 transformiert und zwei Klone von der erhaltenen Transformationsplatte zur Beimpfung einer 5 ml-Vorkultur verwendet. Die Anhydrotetracyclin-Induktion fand 2 h nach der Beimpfung der Hauptkultur statt. Die gesamte Expression dauerte 5 h und wurde bei einem OD-Wert von 1,65 für Klon 1 und 1,63 für Klon 2 abgebrochen. Nach SDS-PAGE und GlcDH-

25 Aktivitätsanfärbung konnten je Klon eine starke GlcDH-Bande (ca. 35 kD) aus 1 ml Zellsuspension nachgewiesen werden.

Bei der Durchführung von SDS-PAGE unter reduzierten und nicht reduzierten Bedingungen wurde kein Unterschied zwischen den erhaltenen GlcDH-Banden deutlich. Hierfür wurden jeweils 500 bis 100 µl der Zellsuspension im SDS-Gel

30 durch GlcDH-Aktivitätsanfärbung mit INT untersucht.

Um die Empfindlichkeit der GlcDH-Aktivitätsanfärbung gegenüber der Coomassie-Färbung zu verdeutlichen wurden Proben aus 100 µl Zellsuspension, sowie

1/5-, 1/10- und 1/20-Verdünnungen der Zellsuspension hergestellt. Das Endvolumen der Verdünnungen betrug ebenfalls 100 µl. Mit dem erhaltenen SDS-Gel wurde nach der GlcDH-Aktivitätsanfärbung eine Coomassie-Färbung durchgeführt, um weitere Proteinbanden sichtbar zu machen. Das daraus resultierende SDS-Gel ist in Abbildung 4 dargestellt. Mittels der GlcDH-Aktivitätsanfärbung ist bei der 1/20-Verdünnung noch eine deutliche Bande erkennbar, wohingegen Coomassie-gefärbte Banden kaum noch wahrnehmbar sind.

Das *Haementeria ghilianii* Tridegin-Strukturgen mit gekoppeltem His-Tag wurde mittels PCR modifiziert, wobei das Plasmid pST106 als Template fungierte. Das amplifizierte Fragment (0,25 kb), das von einer ClaI- und PstI-Erkennungssequenz flankiert wird, wurde mit diesen Enzymen verdaut und in den cytoplasmatischen *E. coli*-GlcDH-Fusionsvektor pAW2 kloniert. Das resultierende Plasmid pAW4 besaß nun ein Tridegin-His-GlcDH-Fusionsprotein, das für ein Protein von etwa 44 kD codiert und unterhalb des starken Tet-Promotors liegt. Der Zellextrakt aus dem *E. coli*-Stamm W 3110, der das cytoplasmatische pAW4-Plasmid beinhaltet, wurde mit Hilfe der SDS-PAGE und GlcDH-Aktivitätsanfärbung analysiert. Dabei konnten mehrere rotviolett gefärbte Banden bei 35, 37, 40 und 43 kD nachgewiesen werden. Bei der 43 kD-Bande handelte es sich um das gewünschte Tridegin-His-GlcDH-Fusionsprotein, dessen Molekulargewicht jedoch etwas kleiner als der theoretische Wert von 44 kD war. Die restlichen nachweisbaren Banden wurden vermutlich durch einen proteolytischen Abbau des Fusionsproteins im *E. coli* erzeugt, denn die kleinste angefärbte Bande von 35 kD entspricht in etwa der Größe der GlcDH. Aufgrund eines Größenvergleichs konnte die gebildete 37 kD-Bande als das His-GlcDH-Abbauprodukt identifiziert werden.

Die Durchführung einer Expressionskinetik ergab, daß 2 Stunden nach der Induktion des Tet-Promotors mit Anhydrotetracyclin der proteolytische Abbau des gebildeten Fusionsproteins eintrat, d.h. ab diesem Zeitpunkt waren zusätzliche Banden im SDS-Gel durch Aktivitätsanfärbung nachweisbar. Das gebildete Fusionsprotein war nicht gegenüber den *E. coli*-Proteasen stabil, was sich in seinem relativ schnellen Proteinabbau zeigt. Durch den Einsatz des konstruierten periplasmatischen GlcDH-Fusionsvektors pAW3, konnte der proteolytische Abbau

des Fusionsproteins in der Zelle vermieden werden, da hierbei das exprimierte Fusionsprotein in den periplasmatischen Zwischenraum der *E. coli*-Zellen sezerniert würde. Die *E. coli*-Proteasen befinden sich vornehmlich im Cytoplasma.

5 Die Sensitivität und Spezifität des GlcDH-Fusionsprotein-Nachweises ermöglichen ein schnelles und einfaches Screening von rekombinanten Fremdproteinen. Die Sensitivität des GlcDH-Nachweissystems wurde mit Hilfe von nativer GlcDH bestimmt. Der Aktivitätsnachweis der nativen GlcDH ergab im SDS-PAA-Gel eine rotviolett gefärbte Bande bei ca. 30-35 kD.

10 Die cytoplasmatische Expression im *E. coli*-Stamm W3110 der rekombinanten GlcDH aus pAW2 ergab das gleiche Molekulargewicht. Der Sensitivitätsvergleich der nativen GlcDH zur rekombinanten GlcDH konnte durch einen Vergleich der Bandenintensitäten stattfinden.

Das entwickelte Testsystem (siehe Beispiele) bietet zudem die Möglichkeit, eine
15 doppelte Anfärbung der SDS-Gele durchzuführen. In der ersten Färbung findet die spezifische Detektion der GlcDH-Banden statt. Zur Hintergrundfärbung kann anschließend eine übliche Proteinfärbung, z. B. eine Coomassie-Anfärbung der restlichen Proteine stattfinden. Die GlcDH behält unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS überraschenderweise und erfindungsgemäß ihre
20 vollständige Aktivität, wodurch der schnelle Nachweis im SDS-Gel ermöglicht wird.

Erfindungsgemäß ist es weiterhin möglich, die Empfindlichkeit des GlcDH-Aktivitätsnachweises, durch Verwendung von Nitroblautetrazolium-Salz (NBT) als
25 Substrat für die GlcDH, zu steigern. Die Reaktionsgeschwindigkeit des GlcDH-Nachweises mittels INT kann jedoch durch den Einsatz von Triton X-100 (1% Endlösung) oder NaCl-Zugabe (1 M Endlösung) weiter gesteigert werden.

Die rekombinanten Fusionsproteine Tridegin/His und Tridegin/His/GlcDH wurden
30 durch Expression des pST106- und pAW4-Plasmids gewonnen (Abb. 1, 2). Nach Zellaufschluß des jeweiligen Expressionsansatzes wurden die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Das Tridegin-His-GlcDH-Fusionsprotein konnte über seinen enthaltenen His-Tag immunologisch

durch die Verwendung eines Anti-^{RGS}•His-Antikörpers im Western-Blot nachgewiesen werden. Als Kontrollen dienten gereinigtes rekombinantes Calin (Blutegelprotein), welches einen terminalen His-Tag besitzt, sowie der Zellextrakt der exprimierter rekombinanter GlcDH, die keinen His-Tag besitzt. Der Anti-^{RGS}•His-

5 Antikörper konnte für das rekombinante Tridegin/His/GlcDH-Fusionsprotein eine Bande bei ca. 37 kD und eine weitere Bande bei ca. 43 kD detektieren (Abb. 6). Vergleicht man die erhaltenen Bandengrößen mit den nach Aktivitätsanfärbung im SDS-Gel erhaltenen Banden, so zeigt sich, daß die 43 kD-Bande das Tridegin-His-GlcDH-Fusions-protein und die 37 kD-Bande das His-GlcDH-

10 Abbauprodukt des gesamten Fusionsproteins darstellt. Das Calin/His-Tag-Protein ergab eine Bande mit ca. 26 kD. Das etwas kleinere rekombinante Tridegin/His-Tag-Protein ergab eine Bande mit ca. 23 kD, sowie weitere Banden, die auf eine Bindung des His-Antikörpers mit weiteren exprimierten Proteinen hinweisen. Der immunologische Nachweis mit dem Anti-^{RGS}•His-Antikörper beweist also, daß

15 das bei 43kD und das bei 37 kD detektierte Protein einen His-Tag enthält. Zudem entsprach diese Proteingröße annähernd der theoretischen Größe (36,5 kD) des GlcDH-Proteins mit gekoppeltem His-Tag.

Zusätzlich zum Expressions-Nachweis des rekombinanten Tridegins wurde die

20 biologische Aktivität des Tridegins als Bestandteil des Tridegin-GlcDH Fusionsproteins, im speziellen Fall aus pAW4, untersucht. Dieser Test beruht auf der Hemmung von Faktor XIIIa durch natives Drüsenhomogenat aus Blutegeln, bzw. gereinigtes Tridegin (Finney et al., 1997). Der modifizierte Test ist in den Beispielen beschrieben. Zur Kontrolle wurde das entsprechende Fusionsprotein aus

25 pST106 und das GlcDH-Protein aus pAW2 exprimiert. Im Vergleich der enzymatischen Aktivität mit rekombinanten Tridegin, das entweder als GlcDH-Tridegin Fusionsprotein oder als Tridegin-His-Tag in E. coli exprimiert worden ist., konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Darüberhinaus zeigten die rekombinanten Tridegin-Proteine aus den beiden unterschiedlichen Expressionen

30 vergleichbare biologische Aktivitäten wie das native Homogenat aus Blutegeldrüsen. Daraus kann gefolgert werden, daß die Fusion mit GlcDH keinerlei störenden Einfluß auf die biologische Aktivität des coexprimierten Fremdgens ausübt.

Tridegin selbst (d. h. nicht als Fusionsprotein) besitzt nach Durchführung einer *E. coli*-Expression keine Aktivität und wird als Inclusion Body gebildet. Wird GlcDH in *E. coli* exprimiert, erhält man ein Enzym mit hoher spezifischer Aktivität und Stabilität in löslicher Form. In Expressionsversuchen konnte nachgewiesen werden, daß Proteine, die ein hohes Löslichkeitsvermögen bei der *E. coli*-Expression besitzen, das Löslichkeitsvermögen der Fremdproteinexpression erhöhen, wenn sie mit diesen fusioniert werden (LaVallie, 1995). Die Fusion von Tridegin mit GlcDH erhöhte auch in diesem Fall die Löslichkeit des Tridegins, denn durch einen biologischen Nachweis, bei dem Tridegin den Faktor XIIIa inhibiert, konnte die Aktivität des Tridegins nach der *E. coli*-Expression als Tridegin-His-GlcDH-Fusionprotein nachgewiesen werden. Das GlcDH-Fusionsprotein wird in *E. coli* in hoher Ausbeute exprimiert.

Die Möglichkeit, klonierte Gene als Fusionsproteine zu exprimieren, die ein Protein von bekannter Größe und biologischer Funktion enthalten, vereinfacht den Nachweis des Genprodukts merklich. Aus diesem Grund sind, wie einleitend bereits erwähnt, zahlreiche Fusionsexpressions-Systeme entwickelt worden, die verschiedene Nachweisstrategien aufweisen.

Im Vergleich zu den bekannten Systemen stellt sich das erfindungsgemäße GlcDH-Fusionssystem in *E. coli* wie in Tab. 2 gezeigt, dar. In einigen Systemen kann das N-terminale Fusionsprotein vom C-terminalen Ziel- oder Fremdprotein abgespalten werden (Collins-Racie et al., 1995).

Tab 2:

Tag/Fusions-partner	MW (kD)	Nachweis	Vorteil
GlcDH	30	Funktionstest im SDS-Gel	Schnell und billig, direkter Nachweis im SDS-Gel
His-Tag (Pogge v. Strandmann et al., 1995)	1-7	Western-blot, ELISA	klein
Strep-Tag (Uhlén et al., 1990)	13	Western-blot	klein
myc-Epitop (Pitzurra et al., 1990; Gazitt et al., 1992)	1-2	Western-blot, ELISA	klein
IgG-Teile, Fc (Moks et al., 1987; Ettlinger et al., 1996)	2-5	Western-blot, ELISA	klein, Selektion von Zellen (FACS)
GFP (Chalfie et al., 1994; Inouye et al., 1994)	27	Fluoreszenz, Western-blot	Selektion von Zellen bereits in Kulturschale, mehrere gleichzeitig nachweisbar (FACS)
Intein (Chong et al., 1997)	48	Western-blot	Fusionspartner kann entfernt werden
GST (Smith, Johnson, 1988; Gosh et al., 1995)	26	Western-blot, colorimetrischer Nachweis in Lösung	Fusionspartner kann entfernt werden
MBP (Chu di Guan et al., 1988; Kellermann et al., 1982)	40	Western-blot	Fusionspartner kann entfernt werden

Verfahren	Voraussetzung	Zeitbedarf	Durchsatz	Sensitivität	Information
GlcDH-Nachweis	GlcDH funktionell aktiv	ca. 3 h	Mittel - Hoch	50 ng	Proteinmenge + Proteingröße
ELISA	2 Antikörper	ca. 1 Tag	Hoch	pg-ng	Proteinmenge
Western-blot	1-2 Antikörper Tag am Protein	1-2 Tage	Klein	ng	Proteingröße + Proteinmenge

Ein sehr großer Vorteil des erfindungsgemäßen GlcDH-Nachweissystem ist die
 5 Tatsache, daß hierfür wie z.B. für den Nachweis mittels Western-blot keine Anti-
 körper oder sonstige Materialien wie z.B. Membranen, Blot-Apparatur, Entwick-

lermaschine mit Filmen, Mikrotiterplatten, Titerplattenlesegerät, u.s.w. benötigt werden. Dadurch entwickelt sich der Nachweis rekombinanter Fusionsproteine mit dem GlcDH-System sehr viel günstiger und schneller. Mit Hilfe des GlcDH-Nachweises kann neben der Information über die Menge des exprimierten Fusionsproteins, auch die entsprechende Größe des Fusionsproteins direkt im SDS-PAA Gel ohne Transfer auf eine Membran festgestellt werden. Ist die Aktivität der GlcDH im Fusionsprotein nachweisbar, so sollte der Fusionspartner in der Regel auch funktionell aktiv sein. GlcDH stört die Faltung des Fusionspartners nicht. Nachfolgend (Tab. 3, unten) wurde ein effizientes Verfahren zur Gewinnung und zum Nachweis eines in *E. coli* gewonnenen Fusionsproteins aus der Literatur ausgewählt, welches die Vorteile des erfindungsgemäßen GlcDH-Fusionsproteinsystems in einem Vergleich zeigt.

Das erfindungsgemäße GlcDH-Fusionsproteinsystem ist ferner besonders geeignet, die Löslichkeit von Proteinen zu erhöhen, die insbesondere in *E. coli* als Inclusion Bodys gebildet werden und deshalb eine anschließende Proteinaufreinigung schwierig und teuer gestalten. Normalerweise müssen Proteine, die als Inclusion Bodys gebildet wurden, durch aufwendige Verfahren in ihren nativen Zustand überführt werden. Dies entfällt bei Anwendung der Fusionsproteine gemäß der Erfindung.

Zusammenfassend stellen sich die Vorteile der erfindungsgemäßen Fusionsproteine in ihrer Verwendung als GlcDH-Nachweissystem wie folgt, dar.

- Stabilität unter SDS und reduzierenden (denaturierenden) Bedingungen
- Sensitiver GlcDH-spezifischer enzymatischer Farbttest
- Sensitivität bis mindestens 50 ng
- Schneller Nachweis direkt im SDS-Gel mit Bestimmung des Molekulargewichts des Fusionspartners
- Möglichkeit zusätzlicher Proteinanfärbungen
- Kostengünstige Materialien, geringer apparativer Aufwand
- gute Expression in *E. coli*, einschließlich des Zielproteins unter Erhaltung der biologischen Aktivität
- Möglichkeit der Vermeidung von Inclusion Bodies des Fremd-/Zielproteins oder anderer durch falsche Faltung erzeugte Aggregate.

- Möglichkeit der Aufreinigung des Fusionsproteins über Affinitätschromatographie z.B. an Farbstoffen (Cibacron Blue 3G)

Tab. 3

Konstruktion/Transformation des <u>ProteinA/GFP-Fusionsvektors</u>	Konstruktion/Transformation des <u>GlcDH/Tridegin-Fusionsvektors</u>
↓	↓
Wachstum der Zellen auf LB-Agarplatten bei 37°C (1 Tag)	Vorkultur in LB(Amp)-Medium bei 37°C (12 h)
↓	↓
Zellwachstum bei 25°C (3 Tage)	Zellwachstum bei 37°C in Hauptkultur mit Induktion (5 h)
↓	↓
Suspendierung der Zellen in Puffer (pH 8,0)	Suspendierung der Zellen in 1x SDS-Ladepuffer
↓	↓
Zellaufschluß und Abzentrifugation der Zelltrümmer	SDS-Zellaufschluß 5 min bei 95°C
↓	↓
SDS-PAGE zur Proteintrennung (1 h)	SDS-PAGE (1 h) mit Zellextrakt
↓	↓
Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran (1 h)	Aktivitätsanfärbung GlcDH im SDS-Gel (30 min)
↓	↓
Blockierungsreaktion (1 h)	
↓	
Antikörperreaktion (1 h)	
↓	
Inkubation in ProteinA-GFP-Arbeitspuffer (20 min)	
↓	
UV-Bestrahlung (365nm) / Analysierung des Blots	Analysierung des SDS-Gels <u>mit Bestimmung des Molekulargewichts</u>

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter, ohne sie zu beschränken.

Beispiel 1:

Primer	Sequenz	Länge	Verwendung
GlcDH # 1	5'- GCGCGAATTCATGTATA CAGATTTAAAAAGAT-3'	32 Basen	PCR-Primer (setzt am 5'-Ende von gdh an und führt eine EcoRI- Schnittstelle ein)
GlcDH # 2	5'- GCGCTTCGAACTATTAG CCTCTTCCTGCTTG-3'	31 Basen	PCR-Primer (setzt am 3'-Ende von gdh an und führt eine SfuI- Schnittstelle ein)
GlcDH # 3	5'- GCGCCTGCAGATGTATA CAGATTTAAAAGAT-3'	31 Basen	PCR-Primer (setzt am 5'-Ende von gdh an und führt eine PstI- Schnittstelle ein)
GlcDH # 4	5'- GCGCAGCGCTCTATTAG CCTCTTCCTGCTTG-3'	31 Basen	PCR-Primer (setzt am 3'-Ende von gdh an und führt eine Eco47III- Schnittstelle ein)
Tridegin # 1	5'- GCGCATCGATATGAAAC TATTGCCTTGCAAA-3'	31 Basen	PCR-Primer (setzt am 5'-Ende von tridegin an und führt eine ClaI- Schnittstelle ein)
Tridegin # 2	5'- GCGCCTGCAGGTGATGG TGATGGTGATGCGA-3'	31 Basen	PCR-Primer (setzt am 3'-Ende von tridegin an und führt eine PstI- Schnittstelle ein)
pASK 75 UPN	5'- CCATCGAATGGCCAGAT GATTA-3'	22 Basen	Sequenzier-Primer (am 5'-Ende IRD 41 markiert, setzt in tet p/o von pRG45 und pST84 an)
PASK 75 RPN	5'- TAGCGGTAAACGGCAGA CAAA-3'	21 Basen	Sequenzier-Primer (5' IRD 41 markiert, setzt in t lpp von pRG 45 und pST84 an)
T 7 Seq.s	5'- TAATACGACTCACTATA GGG-3'	20 Basen	Sequenzier-Primer (5' IRD 41 markiert, setzt an die T7 priming site von pcDNA3.1/Myc-His A, - B, -C an)
Rev Seq.as	5'- TAGAAGGCACAGTCGAG G-3'	18 Basen	Sequenzier-Primer (5' IRD 41 markiert, setzt an die BGH Rever- se priming site von pcDNA3.1/Myc-His A, -B, -C an)

Erfindungsgemäß wurden die oben stehenden Oligonucleotide verwendet (Tab. 4).

Die folgende Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Mikroorganismen. Alle Mikroorganismen stammen von *E. coli* K12 ab und gehören der Risikogruppe 1 an.

5 Tab. 5

Stamm	Gattung/ Art	Genotyp	Literatur
Top10F' One Shot™ Cells	<i>E. coli</i>	F'(lacI ^q Tn10(Tet ^R)) <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Top10F' OneShot™ Kit von Invitrogen®
Epicurian Coli®XL1-Blue MRF' Cells	<i>E. coli</i>	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> (F' <i>proAB lacI^qΔM15Tn10</i> (Tet ^r))	Stratagene's Competent Cells
TOP10 OneShot™ Cells	<i>E. coli</i>	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	TOPO TA Cloning® Kit (Version C) von Invitrogen®
W 3110	<i>E. coli</i>	F' λ ⁻ WT <i>E. coli</i>	B. Bachmann, Bacteriol. Rev. 36(72) 525-557

Spenderorganismus: Expressionsstamm M 7037 (*E. coli* N 4830/pJH 115) v. 21.10.96 (Fa. Merck).

pJH 115: pUC-Abkömmling, 5,9 kb, O_LP_L-Promotor, *gdh*, *to* (Terminator), *galk* (Galaktosidase-Gen), *bla* (β-Lactamase-Gen), *ori* (Replikationsursprung), 2 HindIII-, 2 BamHI- und je eine EcoRI- und ClaI-Schnittstelle.

Beispiel 2:

Transformation von Plasmiden in kompetente E. coli-Zellen:

15 SOC-Medium: 20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast-Extract, 0,5 g NaCl, 0,2 g KCl ad 1 l H₂O_{bid.}, autoklavieren. Vor Gebrauch zugeben: 0,5 ml 1 M MgCl₂ / 1 M MgSO₄ (sterilfiltriert), 1 ml 1 M Glucose (sterilfiltriert)

LB (Amp)-Agarplatten: 1 l LB-Medium (ohne Ampicillin), 15 g Agar-Agar zusammengeben, autoklavieren, auf ca. 60°C abkühlen und 1 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml). Durchführung:

<u>Ansatz</u>	1-5 µl	Ligationsprodukt oder Plasmid-DNA (5-50 ng/µl)
	50 µl	kompetente Zellen
	450 µl	SOC-Medium

- kompetente Zellen 10 min auf Eis auftauen
- DNA zu den kompetenten Zellen geben
- 30 min auf Eis inkubieren
- 10 · Hitzeschock: 30 sek bei 42° C (Wasserbad)
- Zellen für 2 min auf Eis stellen
- 450 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugeben
- 1 h bei 37° C und 220 rpm inkubieren
- je 100 µl des Ansatzes auf einer vorgewärmten LB(Amp)-Platte ausstreichen
- 15 · Platten bei 37° C über Nacht inkubieren

Beispiel 3:

TOPO-TA-Cloning® und -Ligation

- TOPO-TA-Cloning® ist ein fünf-minütiges Klonierungsverfahren für mit *Taq*-
- 20 Polymerase amplifizierte PCR-Produkte.
- Der TOPO-TA-Cloning®-Kit (Version C) der Firma Invitrogen wurde zur direkten Klonierung von PCR-Produkten entwickelt. Das System nutzt die Eigenschaft thermostabiler Polymerasen, die am 3'-Ende aller Duplex-Moleküle bei einer PCR ein einzelnes Deoxyadenosin anhängen (3'-A-Überhang). Mit Hilfe dieser 3'-A-
- 25 Überhänge können die PCR-Produkte direkt mit einem Vektor verknüpft werden, der 3'-T-Überhänge besitzt. Der Kit liefert für diesen Zweck den speziell entwickelten pCR®2.1-TOPO-Vektor. Der 3,9 kb große Vektor besitzt ein *lacZ*-Gen für blau/weiß-Selektion, Ampicillin- und Kanamycinresistenzgene. Die Klonierungsstelle wird beidseitig von einer einmaligen EcoRI-Schnittstelle flankiert.

30 Ligationsansatz:

2 µl	Frisches PCR-Produkt (10 ng/µl)
1 µl	pCR®-TOPO-Vektor
2 µl	steriles Wasser

5 µl Gesamtvolumen

- Ansatz vorsichtig mischen und 5min bei RT inkubieren
- kurz anzentrifugieren und Tube auf Eis legen
- Ligationsprodukte sofort in der One Shot™-Transformation einsetzen

5

Zur Kontrolle dient ein 5 µl-Ansatz ohne PCR-Produkt, der nur aus Vektor und Wasser besteht.

Die One-Shot™-Transformation wurde nach folgender Vorschrift durchgeführt:

2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol zu den 50 µl auf Eis aufgetauten One Shot™

10 TOP10 kompetenten Zellen geben;

2 µl der TOPO-TA-Cloning® Ligation pro Vial kompetente Zellen zugeben;

30 min auf Eis inkubieren

Hitzeschock: 30 sek bei 42° C;

2 min auf Eis abkühlen;

15 250 µl SOC-Medium (RT) zugeben;

Inkubation der Vials bei 37° C und 220 rpm für 30 min;

100 µl jedes Transformationsansatzes auf 37° C vorgewärmten LB(Amp)-Platten ausstreichen;

Platten über Nacht bei 37° C inkubieren;

20 die erhaltenen Transformanten werden nach Minipräparation (3.2.2.1) mit geeigneten Enzymen im analytischen Restriktionsverdau analysiert.

Beispiel 4:

Genexpression in E.coli-Zellen:

25 Die Durchführung ist wie folgt skizziert:

- aus erfolgreich sequenzierten Klonen wird das Plasmid isoliert und in den Expressionsstamm W3110 transformiert
- von der Transformationsplatte wird ein Klon gepickt und damit eine 5 ml ÜN-Vorkultur hergestellt
- 30 · Vorkultur auf einer LB(Amp)-Platte ausstreichen und später durchzuführende Expressionen mit Klonen dieser Platte beimpfen

- mit 1 ml der Vorkultur wird nun die 50 ml-Hauptkultur angeimpft (Verhältnis 1:50) und der OD₆₀₀-Wert bestimmt (Referenzmessung mit unbeimpftem LB(Amp)-Medium)
- Hauptkultur (in 200 ml-Erlenmeyerkolben) bei 37° C und 220 rpm inkubieren
- 5 · OD₆₀₀-Wert alle 30 min bestimmen
- wird ein OD von 0,5 erreicht findet die Induktion der Zellen mit 10 µl Anhydrotetracyclin (1 mg/ml) pro 50 ml Zellsuspension statt (f. c. 0,2 µg Anhydrotetracyclin pro ml Zellsuspension) und es wird erneut der OD-Wert bestimmt (0-Wert)
- jede Stunde OD-Wert bestimmen und 3 h nach Induktionszeitpunkt Wachstum
- 10 beenden
- 1 ml gut durchmischte Bakteriensuspension in Tube geben und 5 min bei 6000 rpm abzentrifugieren (nach Bedarf kann auch weniger Suspension verwendet werden)
- Überstand absaugen und Pellet in 100 µl 1x red. Probenpuffer homogenisieren;
- 15 · Homogenat 5 min kochen, auf Eis abkühlen und kurz abzentrifugieren;
- 10 µl Probe pro Tasche eines SDS-Gels auftragen und Elektrophorese (3.2.16) durchführen;
- Gel mittles Coomassieblau-Färbung und/oder gemäß Methode nach Beispiel 5
- 20 anfärben.

Zellaufschluß:

Zellen einer 50 ml-Übernacht-Kultur bei 3500 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugieren. Den entstandenen Überstand abschütten und die Zellen in 40 ml 100 mM Tris/HCl (pH 8,5) resuspendieren. Die suspendierten Zellen werden mit Hilfe der

25 French-Press in einem 1 Zoll Zylinder mit 18000 psi aufgeschlossen. Hierbei werden die Zellen durch eine enge Öffnung (< 1 mm) gepreßt und einem plötzlichen Druckabfall ausgesetzt. Durch die Druckdifferenz beim Durchqueren der Öffnung zerplatzen die Zellen. Die Struktur der Zellproteine bleibt dabei erhalten. Damit das gewünschte Protein nicht proteolytisch abgebaut wird, sollte man so-

30 fort nach dem Zellaufschluß einen Protease-Hemmer zugeben. Hierfür wird je 40 ml Proteinlösung 1 Tablette des EDTA-freien Complete™ - Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Roche) zugegeben und bei RT gelöst. Die anschließende 20-minütige

Zentrifugation bei 6000 rpm führt zum Abtrennen der Zelltrümmer sowie großer Teile DNA und RNA. Die Proben werden anschließend bei -20° C eingefroren.

Beispiel 5:

5 Aktivitätsanfärbung der GlcDH-Bande im SDS-Gel:

Die Glucose-Dehydrogenase-Bande kann mit Hilfe von Iodphenylnitrophenylphenyltetrazoliumchlorid (INT) spezifisch im SDS-Gel nachgewiesen werden. Dies ist nur möglich, weil durch die SDS-Behandlung die Aktivität der GlcDH nicht zerstört wird.

- 10 Der Nachweis der GlcDH erfolgt mit Hilfe einer Farbreaktion. Dabei wird der bei der Reaktion gebildete Wasserstoff auf das Tetrazoliumsalz INT übertragen, wobei ein violettes Formazan entsteht. Phenanzinmethosulfat dient als Elektronenüberträger.

15 Vorinkubationspuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 7,5)

15,76 g Tris/HCl

ad 1 l H₂O_{bid.}, mit NaOH pH 7,5

Reaktionspuffer (0,08% INT, 0,005% Phenanzinmethosulfat, 0,065% NAD, 5%

20 Glc in 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)

0,8 g Iodphenylnitrophenyltetrazoliumchlorid (INT)

0,05 g Methylphenaziniummethosulfat
(Phenanzinmethosulfat)

0,65 g NAD

25 50 g D-(+)-Glucose-monohydrat (Glc)

ad 1 l 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)

Lagerpuffer für GlcDH:

26,5 g EDTA

30 15 g Na₂HPO₄

ad 1 l, pH 7,0 (NaOH)

Probenvorbereitung:

- Proben und Marker in Probenpuffer verdünnen.
- 3 min in Wasserbad kochen und auf Eis abkühlen und abzentrifugieren

5

SDS-Gelelektrophorese nach Standardmethoden.Aktivitätsanfärbung:

- SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinbanden 5 min in Vorinkubationspuffer bei
- 10 37° C unter leichtem Schütteln inkubieren
- Puffer abgießen und mit ausreichender Menge Reaktionspuffer (RT) überschichten, bei 37° C unter leichtem Schütteln inkubieren (Puffer mind. 1 x wechseln)
- nach ca. 30 min Inkubation sind die Banden mit GlcDH rotviolett angefärbt.
- 15 · Gel in Vorinkubationspuffer waschen, fotografieren und trocknen
- bei Bedarf eine anschließende Coomassie-Färbung durchführen und Gel danach trocknen

Beispiel 6:

- 20 *Immunologischer Nachweis mit dem ECL-System (Western Exposure™ Chemiluminescent Detektion System):*

Der Nachweis von Proteinen, die an einen His-Tag gekoppelt sind, erfolgt indirekt mit zwei Antikörpern. Als erster AK wird der Anti-^{RGS}His Antibody (QIAGEN) für die Detektierung von 6xHis-getaggten Proteinen eingesetzt. Der Nachweis des

25 entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt dann mit Hilfe des Peroxidase (POD)-markierten AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-Antikörpers. Durch die gebundene Peroxidase entsteht nach Zugabe des ECL-Substrat-Gemisch ein chemilumineszierendes Produkt, das mit einem High Performance Chemiluminescence Film detektiert werden kann.

- 30 Ponceau S-Lösung (0,5 % Ponceau S, 7,5 % TCA)

1,25 g Ponceau S

18,75 g TCA

auf 250 ml bidest. Wasser auffüllen.

10x PBS-Puffer pH 7,4

14,98 g Di-natrium-hydrogenphosphat x 2 H₂O

2,13 g Kalium-di-hydrogenphosphat

5 87,66 g Natriumchlorid

auf 1 l auffüllen, pH 7,4 überprüfen.

Der Puffer wird in der 1x Konzentration eingesetzt.

Biometra-Blotpuffer

10 25 mM Tris

150 mM Glycin

10 % Methanol

Blockierungsreagenz

15 5 % Magermilchpulver

in 1x PBS-Puffer lösen.

Waschpuffer

0,1 % Nonidet™ P-40 (Sigma)

20 in 1x PBS-Puffer lösen

Der Nachweis wurde wie folgt, durchgeführt:

- PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) und 6x Blotting-Filterpapier auf Gelgröße zuschneiden

- PVDF-Membran 15 sek in Methanol und anschließend in Biometra-Blotpuffer
25 equilibrieren, ebenso mit dem SDS-Gel und den Filterpapieren verfahren

- Blot-Aufbau: 3 Lagen Filterpapier, Membran, Gel, 3 Lagen Filterpapier in Blotkammer aufbauen (Luftblasen müssen dabei zwischen den Lagen herausgedrückt werden, da sonst an diesen Stellen kein Proteintransfer stattfindet)

- Blotten: 1-1,5 mA/cm² Gel für 1 h

- 30 · Kontrolle des Proteintransfers:

- Nach dem Blotten wird der Proteintransfer auf die PVDF-Membran durch Anfärbung mit Ponceau S kontrolliert: Membran mindestens 2 min mit 0,5 % Ponceau S-Lösung in einer Schale unter leichtem Schütteln inkubieren. Farbstoff

abgießen (wiederverwendbar) und Membran unter fließendem VE-Wasser entfärben. Dabei werden nur starke Proteinbanden gefärbt. Der Molekulargewichtsmarker wird mit einem Kugelschreiber markiert.

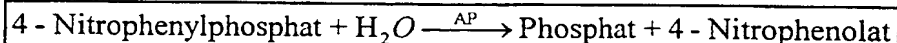
· Entwicklung des Blots:

- 5 Alle Inkubationen sollten in einer Schale auf einem Celloshaker und im Rollerschrank in 50 ml-Falcon-Röhrchen durchgeführt werden, denn die Membran darf bei den folgenden Schritten keinesfalls austrocknen.
- (1) Absättigen
30 min bei 37° C im Rollerschrank mit PBS/5% Magermilchpulver
- 10 (2) 1. Antikörper: 1:2000 verdünnt in PBS/5% Magermilchpulver (Volumen ca. 7 ml/Membran) 1 h bei 37° C inkubieren
- (3) Waschen: Membran mit reichlich Waschlösung PBS/0,1% NP-40 waschen
3 x 5 min waschen
- (4) POD-markierter AK: 1:1000 verdünnt in PBS/5% Magermilchpulver (neues
15 Röhrchen) 1 h bei 37° C inkubieren
- (5) Waschen: Membran mit reichlich Waschlösung PBS/0,1% NP-40 waschen
3 x 5 min waschen
- (6) Entwickeln: Membran gut schwenken (nicht trocknen lassen) und auf eine
Plastikfolie legen, mit dem ECL-Entwicklungslösung (Amersham) vollständig für 1
20 min überschichten, Membran schwenken und in eine Doppelfolie geben, Polaroid-Hyperfilm auflegen und entwickeln

Beispiel 7:

- Tridegin-Nachweis durch Inhibierung von Faktor XIIIa (Methode nach Finney et al., 1997, erfindungsgemäß modifiziert):*
- 25 Anstelle des natürlichen Substrates von Faktor XIIIa, nämlich aminogruppenhaltigen Seitenketten von Aminosäuren, werden auch synthetische Amine in geeignete Proteinsubstrate eingebaut. Diese synthetischen Amine verfügen über intramolekulare Marker, die den Nachweis ermöglichen.
- 30 Der Amineinbau-Test ist ein Festphasen-Test. Die Beschichtung der Titerplatten erfolgt mit Casein. In dieses Casein erfolgt der Einbau des Substrates Biotinamidopentylamin durch Faktor XIIIa. Das Casein-Biotinamidopentylamin-Produkt kann durch das Fusionsprotein Streptavidin-alkalische Phosphatase (Strep/AP)

nachgewiesen werden. Dieser "Sandwich" kann durch Detektion der Phosphataseaktivität mittels p-Nitrophenyl-phosphat erfolgen. Dabei läuft folgende Reaktion ab:



5

Die Bildung des 4-Nitrophenolats wird photometrisch bei 405 nm bestimmt und ist der AP-Aktivität direkt proportional. Durch die hochaffine Wechselwirkung von Biotin und Streptavidin ist die Phosphataseaktivität der Faktor XIIIa-Aktivität ebenfalls proportional, d.h., je stärker die Absorption (Gelbfärbung) desto größer die Faktor XIIIa-Aktivität (Janowski, 1997). EDTA ist ein unspezifischer Inhibitor für Faktor XIIIa, dessen Cofaktor Ca^{2+} durch EDTA in einem Chelat-Komplex gebunden wird. Aus diesem Grund dürfen die verwendeten Proteinproben kein EDTA enthalten und wurden mit einem EDTA-freien Protease-Inhibitoren-Cocktail (Boehringer) vorbehandelt.

15 Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Lösung A: 0,5 % Magermilchpulver in Waschpuffer lösen

Lösung B: 0,5 mM Biotinamidopentylamin, 10 mM DTT, 5 mM CaCl_2 in Waschpuffer lösen

Lösung C: 200 mM EDTA in Waschpuffer lösen

20 Lösung D: 1,7 µg/ml Streptavidin-alkalische Phosphatase in Lösung A lösen

Lösung E: 0,01 % (w/v) Triton X-100 in Waschpuffer lösen

Lösung F: 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat, 5 mM MgCl_2 in Waschpuffer lösen

Coating:

• 200 µl / Well Lösung A nach Probenanzahl auf Titerplatte verteilen

25 30 min bei 37° C schütteln (Thermoshaker)

Waschen:

• 2 mal mit 300 µl / Well Waschpuffer waschen

Einbaureaktion:

• 10 - 150 µl/Well Proben verteilen, je 5 µl/Well Faktor XIIIa und 200 µl/Well Lösung B zugeben

30

30 min bei 37° C schütteln

Stop:

• 2 mal mit 300 µl/Well Lösung C (Faktor XIIIa Inhibierung) waschen

- 2 mal mit 300 µl/Well Waschpuffer waschen

Strep/AP-Bindung (spezifisch):

- 250 µl/Well Lösung D zugeben
- 60 min bei RT inkubieren

5 Waschen:

- mit 300 µl/Well Lösung E waschen (löst die nicht kovalent gebundenen Proteine ab)
- 4 mal mit 300 µl/Well Waschpuffer waschen

Substrat:

- 10 · 50 µl/Well Lösung F + 200 µl/Well Waschpuffer zugeben
- 30 min bei RT inkubieren

Messung mit computergestützter Auswertung in einem Microtiterplattenreader bei 405 nm durchführen.

15 **Beispiel 8:** Empfindlichkeit der Detektion von GlcDH

Die angegebene Menge an aufgereinigtem GlcDH wurde auf ein SDS-Gel gegeben. Nach dem Lauf wurde das SDS-Gel 5 Minuten lang bei 37°C im Vorinkubationspuffer inkubiert. Der Puffer wurde verworfen und das Gel wurde im Reaktionspuffer bei 37°C geschüttelt. In einem weiteren Schritt wurde das Gel mit Coomassie Blue angefärbt.

- 20 massie Blue angefärbt.

Reaktionspuffer für 1 Liter:

0,1M Tris/HCL, pH 7,5

0,5M NaCl

0,2% Triton-X-100

- 25 0,8g Iodphenylnitrophenyltetrazoliumchlorid

0,05g Methylphenaziniummethosulfat

0,65g NAD

50g D-(+)-Glucose-monohydrat

- 30 Pre-Inkubations-Puffer:

0,1M Tris/HCl, pH 7,5

0,5 M NaCl

Patentansprüche

1. Rekombinantes Fusionsprotein, bestehend aus mindestens einer ersten und zweiten Aminosäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Sequenz die biologische Aktivität von Glucose-Dehydrogenase aufweist.
2. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Sequenz ein beliebiges rekombinantes Protein / Polypeptid X ist oder Teile davon darstellt.
3. Rekombinantes Fusionsprotein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich mindestens eine weitere für die Detektion geeignete Erkennungssequenz ("Tag-Sequenz") aufweisen kann.
4. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Fusionsprotein gemäß der Ansprüche 1 – 3 kodiert.
5. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNA gemäß Anspruch 4 enthält.
6. Wirtszelle zur Expression von rekombinanten Proteinen / Polypeptiden, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 5 enthält.
7. Verwendung von Glucose-Dehydrogenase als Detektorprotein für ein beliebiges rekombinantes Protein / Polypeptid X in einem Fusionsprotein gemäß der Ansprüche 1 bis 3.
8. Verwendung von Glucose-Dehydrogenase in einem Nachweissystem für die Expression eines rekombinanten Proteins / Polypeptids X als Bestandteil eines Fusionsproteins gemäß der Ansprüche 1 bis 3.

9. Verwendung von Glucose-Dehydrogenase zum Nachweis für Protein-Protein Interaktionen, wobei ein Partner dem rekombinanten Protein / Polypeptid X in den Ansprüchen 1 bis 3 entspricht.

5

10. Verwendung von Glucose-Dehydrogenase in einem Fusionsprotein gemäß Ansprüchen 1- 3 als Detektorprotein für ein beliebiges drittes Protein / Polypeptid, welches nicht Bestandteil des Fusionsproteins gemäß der Ansprüche 1 - 3 ist und an die zweite Sequenz des Proteins / Polypeptids X des besagten Fusionsproteins zu binden vermag.

10

11. Verwendung eines Expressionsvektors nach Anspruch 5 bei der Optimierung der Expression eines rekombinanten Proteins / Polypeptids X in einem rekombinanten Herstellungsverfahren.

15

12. Verwendung einer Wirtszelle nach Anspruch 6 bei der Optimierung der Expression eines rekombinanten Proteins / Polypeptids X in einem rekombinanten Herstellungsverfahren.

20

13. Verfahren zum schnellen Nachweis eines beliebigen rekombinanten Proteins / Polypeptids X mittels Gelelektrophorese, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fusionsprotein gemäß der Ansprüche 1 bis 4 hergestellt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wird und das nachzuweisende rekombinante Protein / Polypeptid im Gel über die Enzymaktivität der Glucose-Dehydrogenase sichtbar gemacht wird.

25

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Gelelektrophoresemethode die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet wird.

30

15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der Enzymaktivität der Glucose-Dehydrogenase eine Farbreaktion auf Basis von Tetrazoliumsalzen eingesetzt wird.
- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Tetrazoliumsalz Iodphenylnitrophenyl-phenyltetrazolium-Salz (INT) oder Nitroblau-tetrazolium-Salz (NBT) eingesetzt wird.
- 10 17. Verfahren nach Anspruch 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß nach der spezifischen Anfärbung der Glucose-Dehydrogenase eine generelle Protein-Anfärbung erfolgt.



1/9

Fig.1

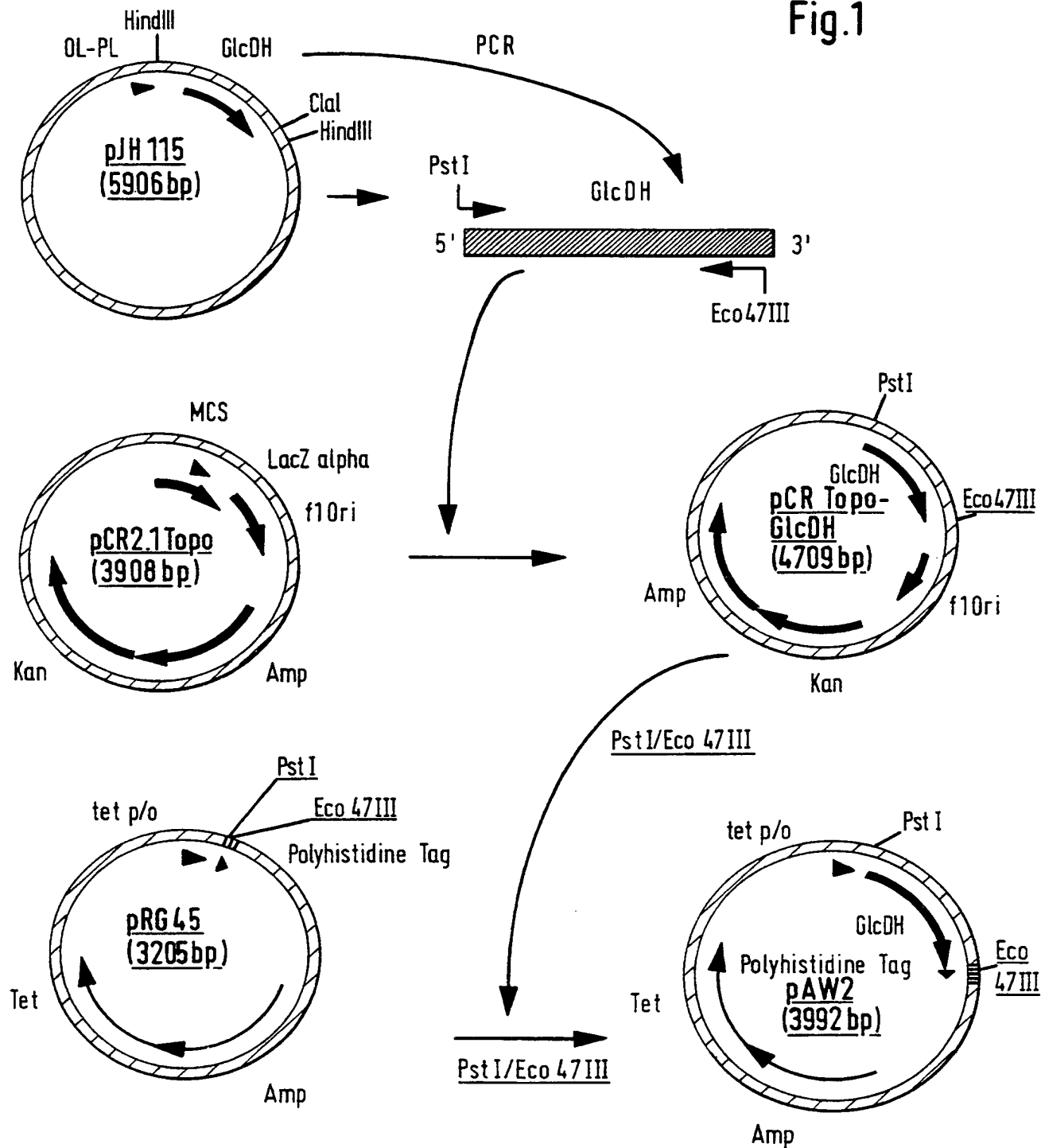
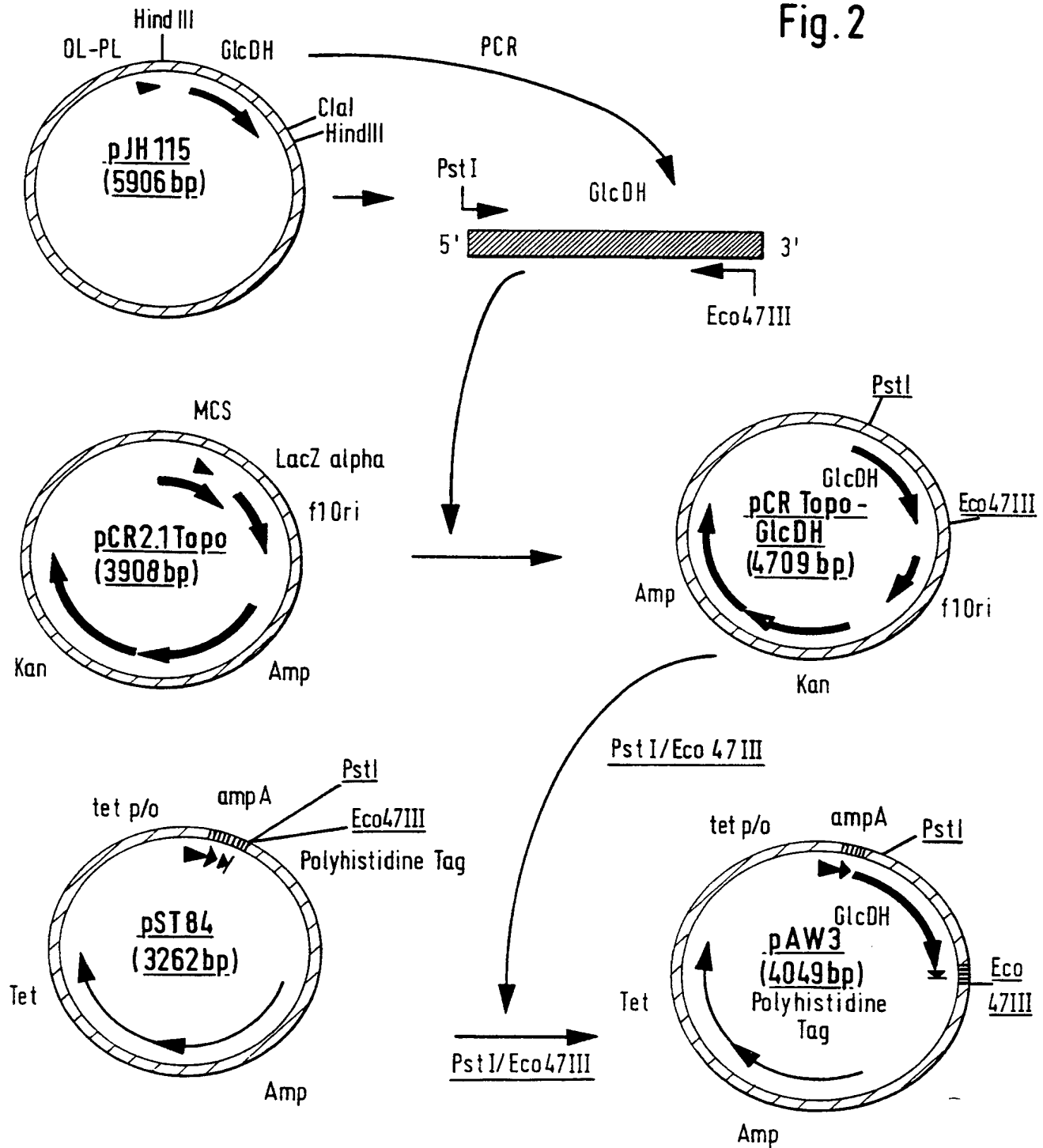




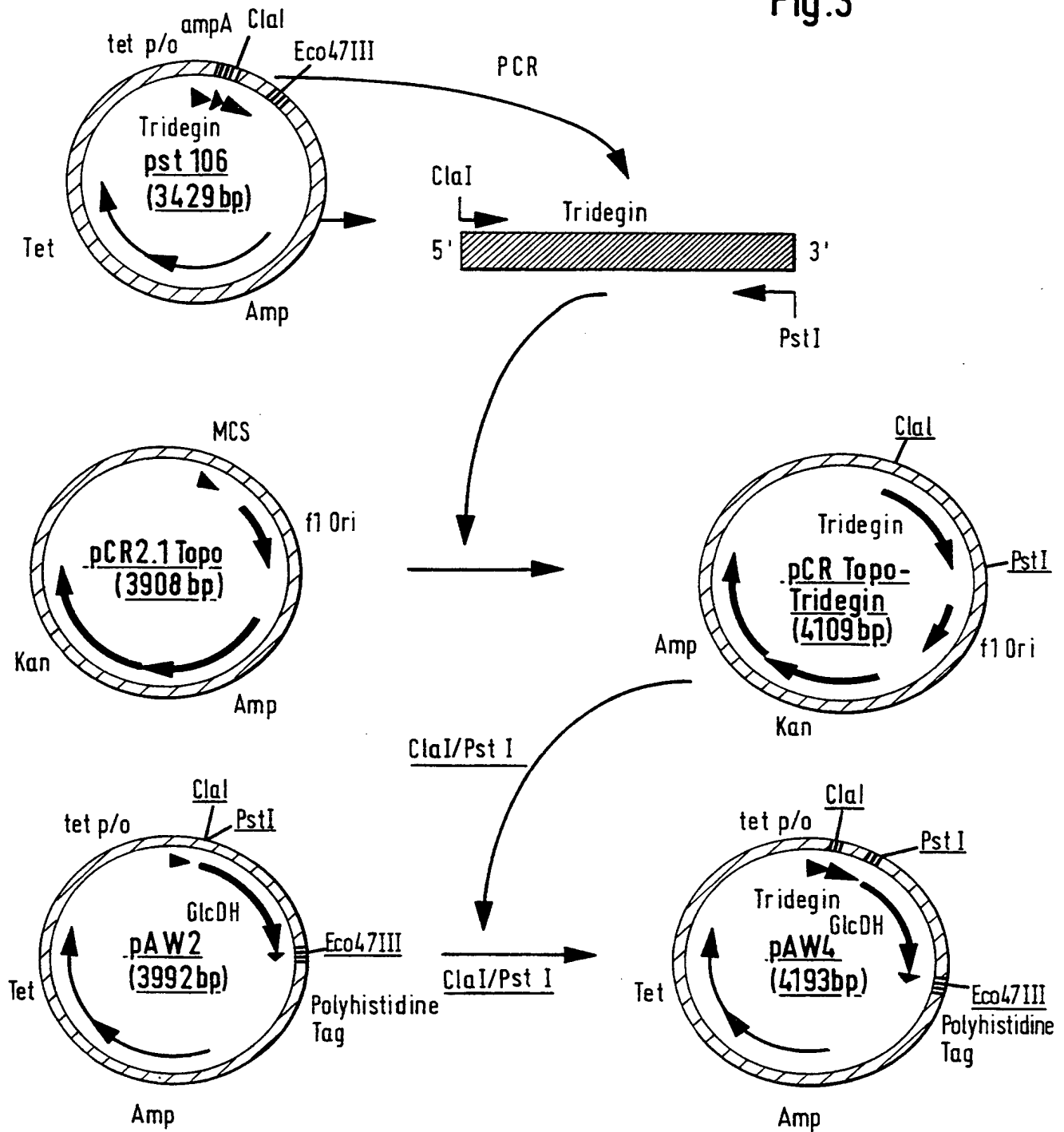
Fig. 2





3/9

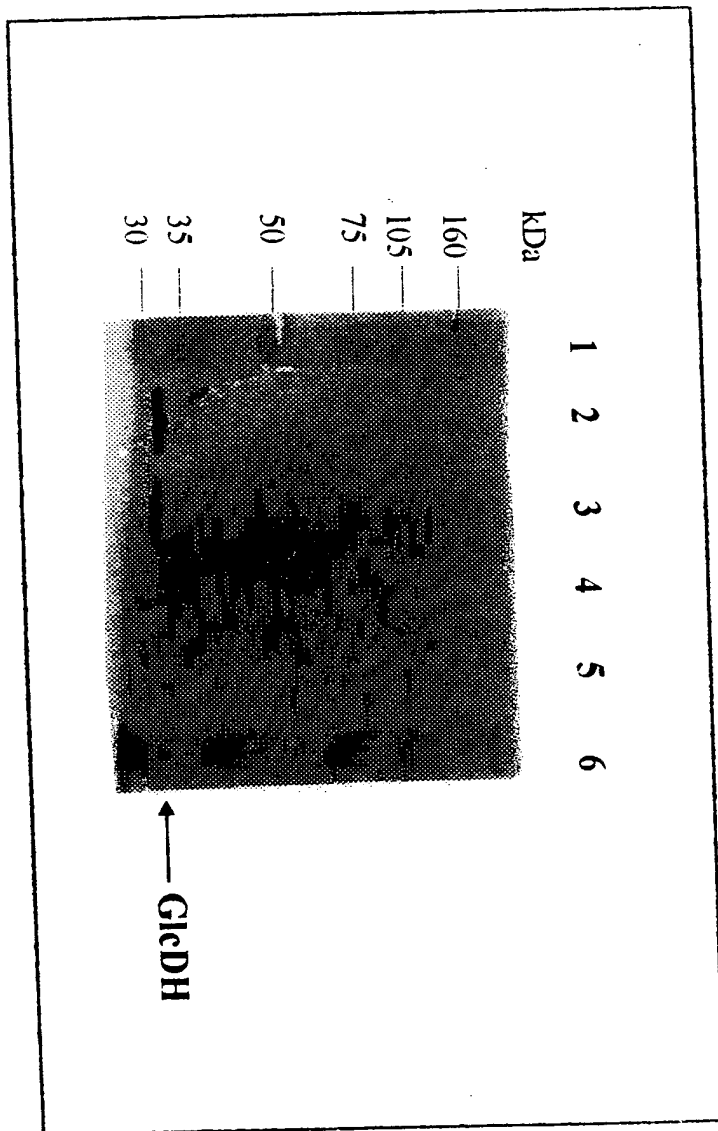
Fig.3





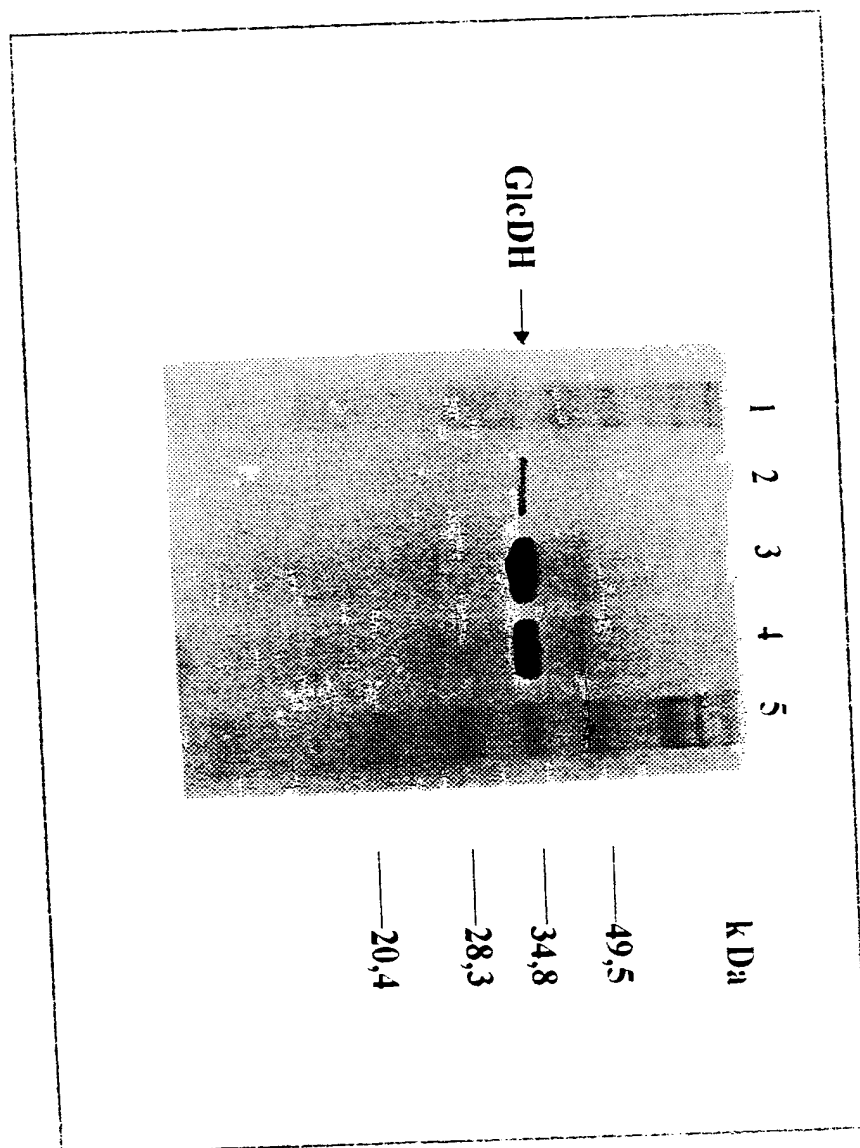
4/9

Fig. 4



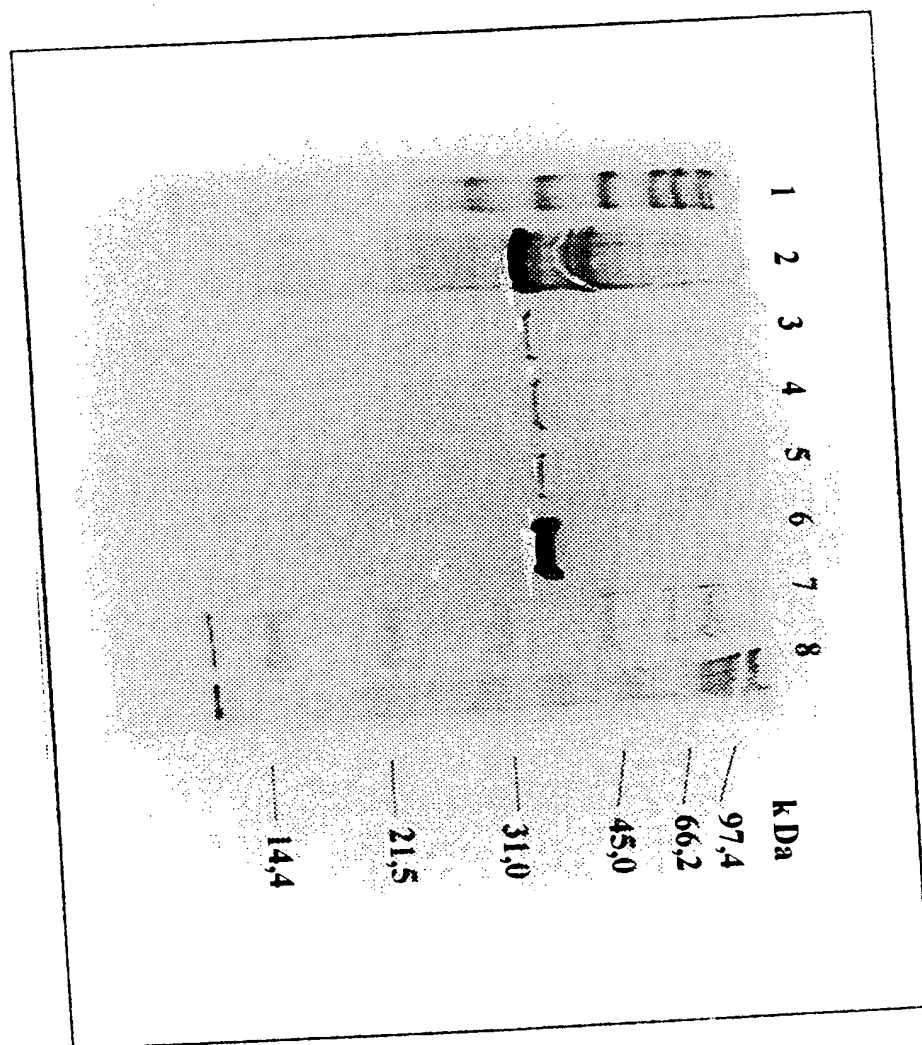
5/9

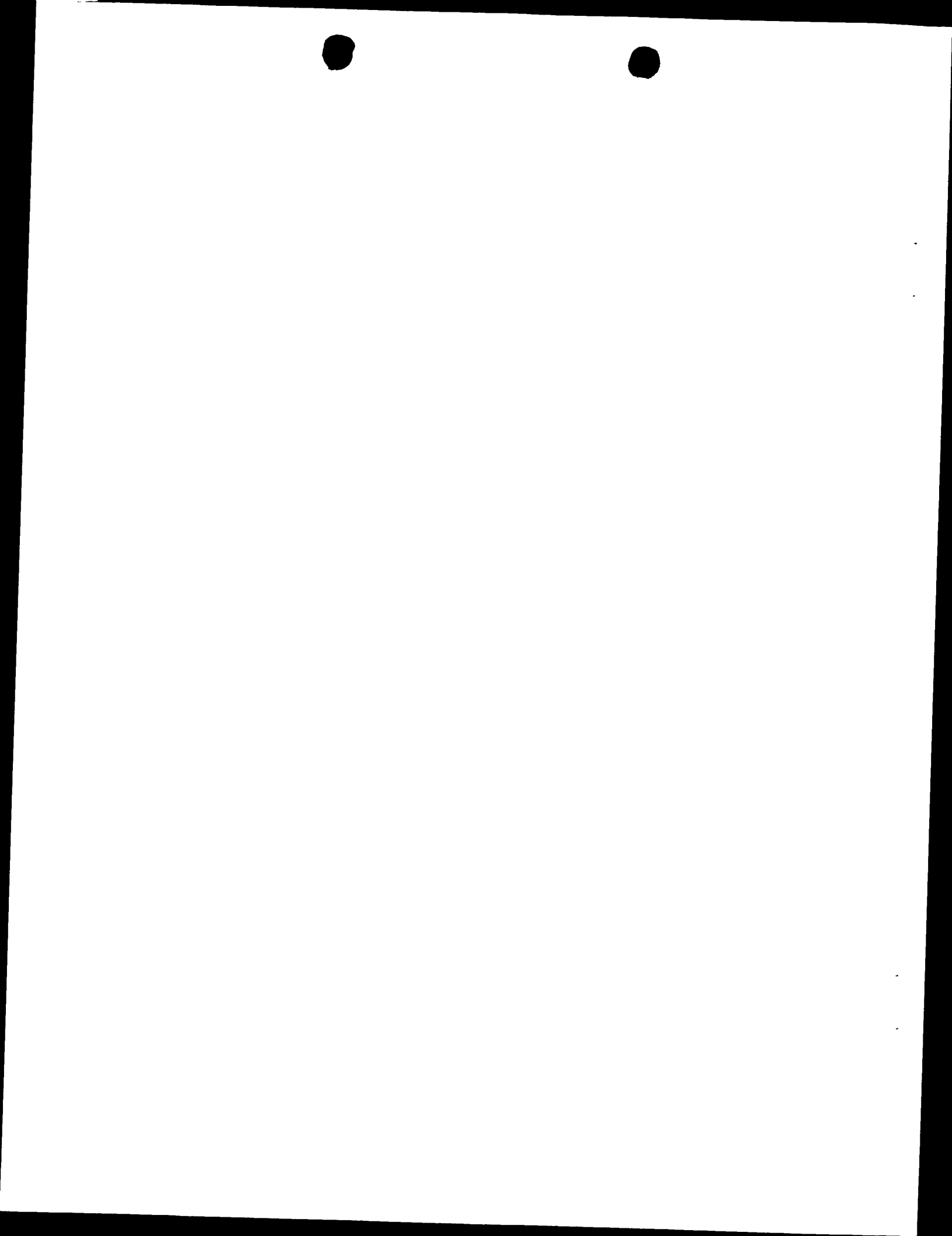
Fig. 5



6/9

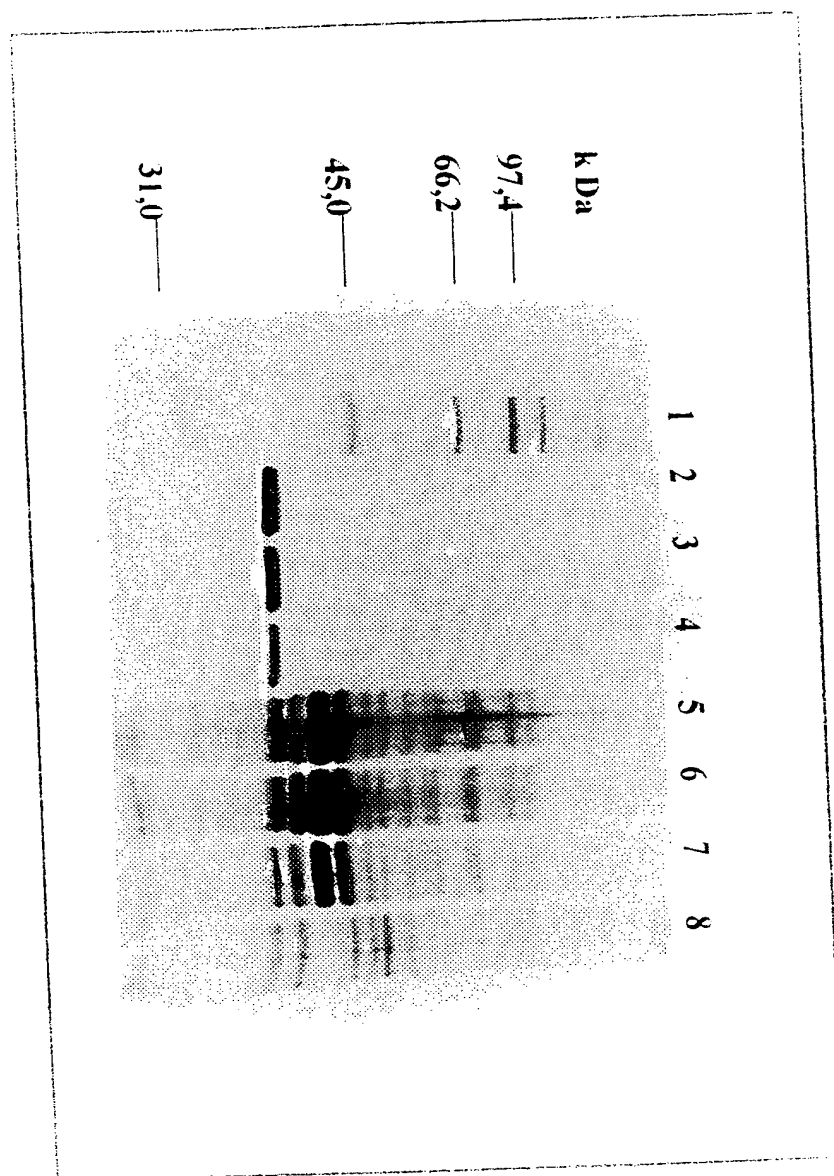
Fig. 6

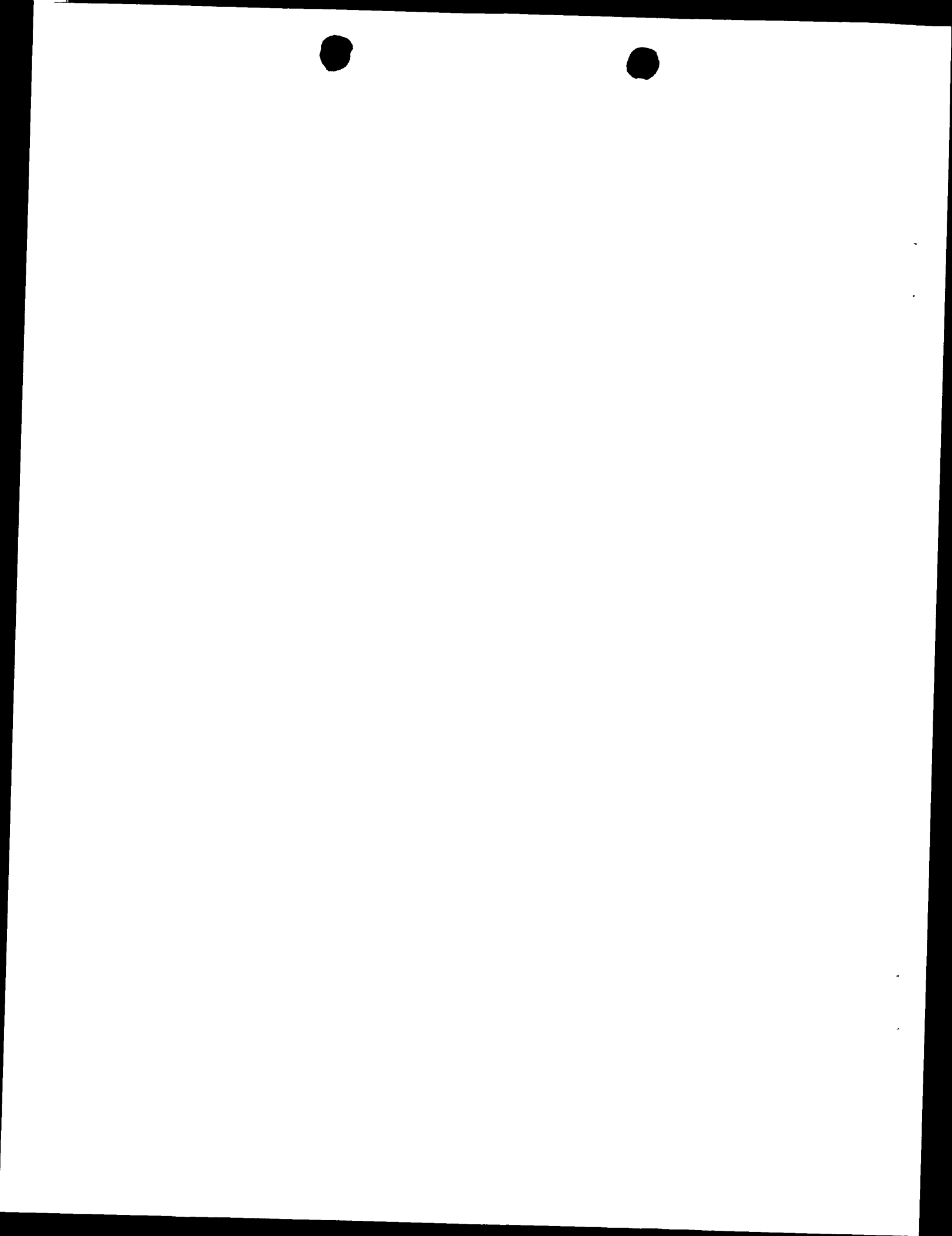




7/9

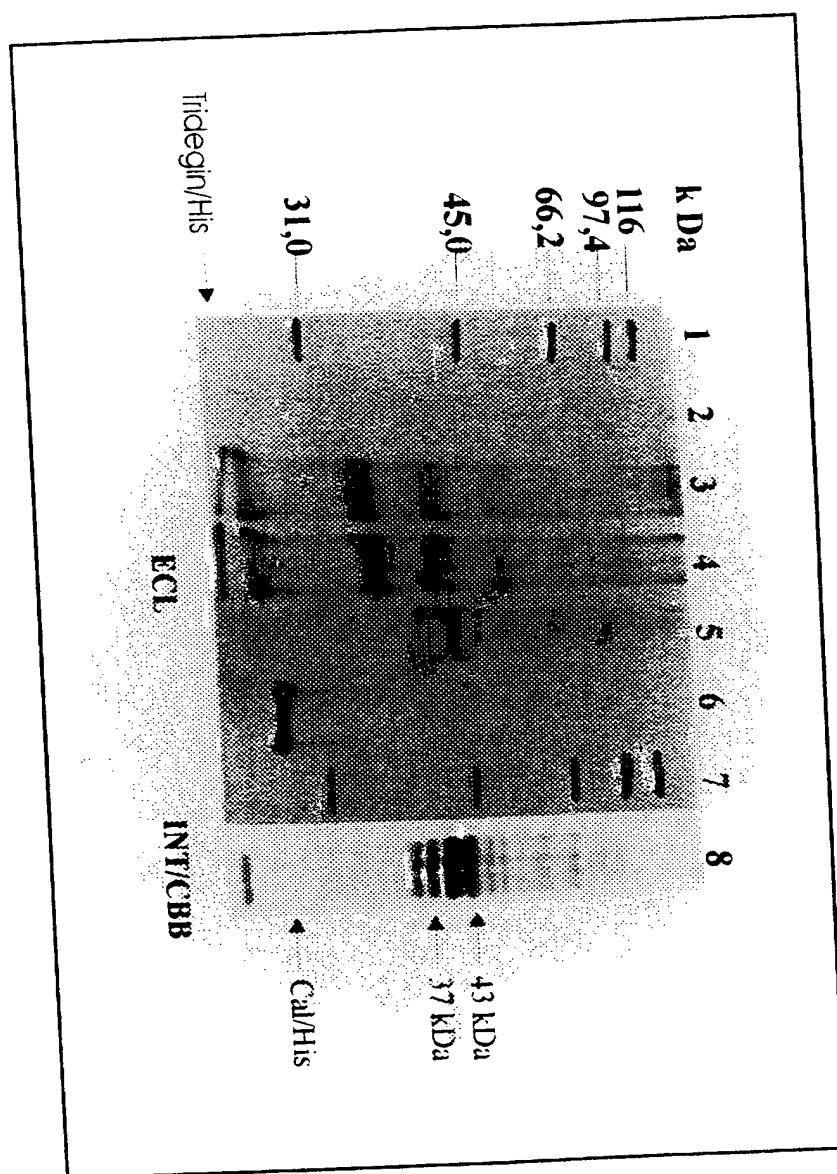
Fig. 7

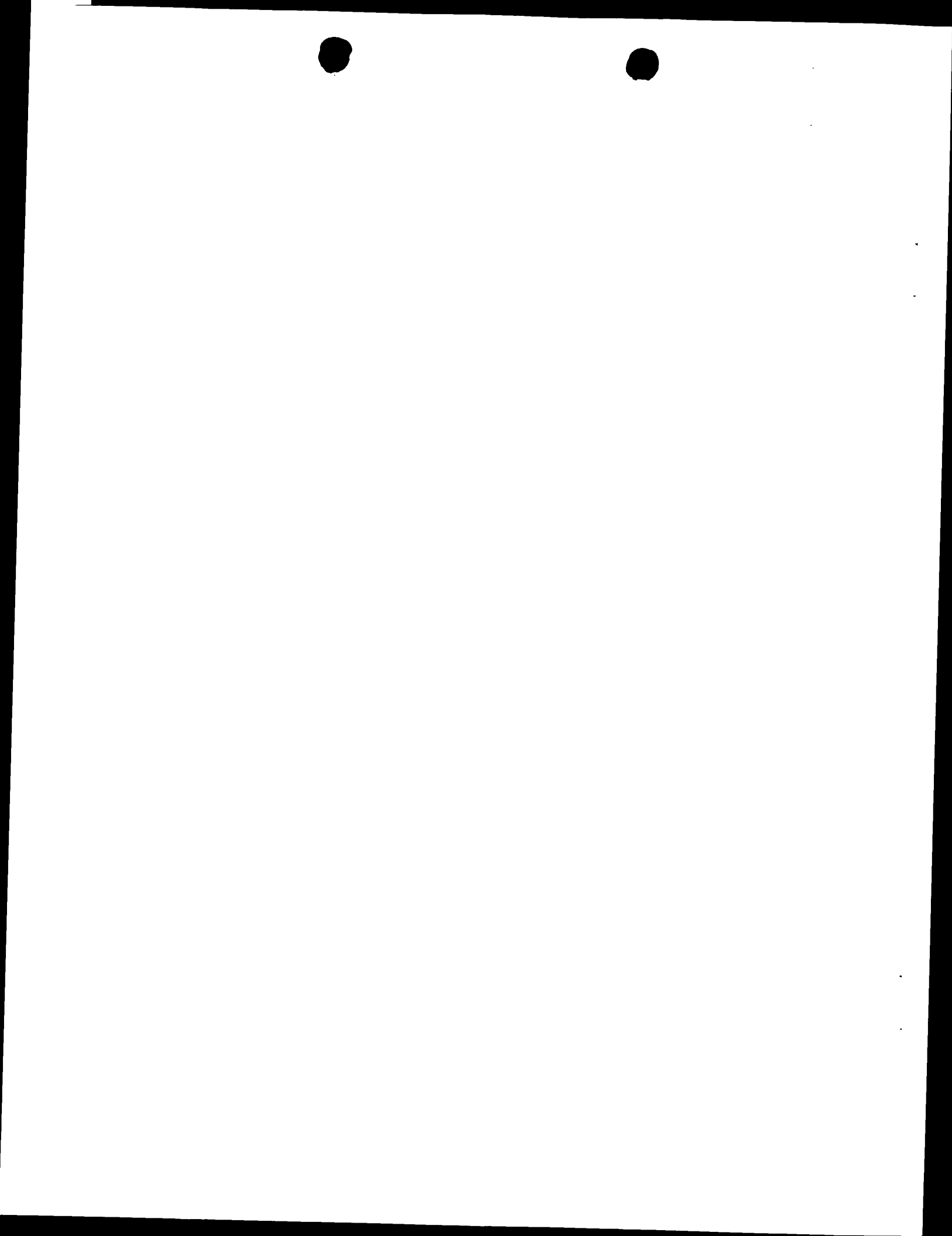




8/9

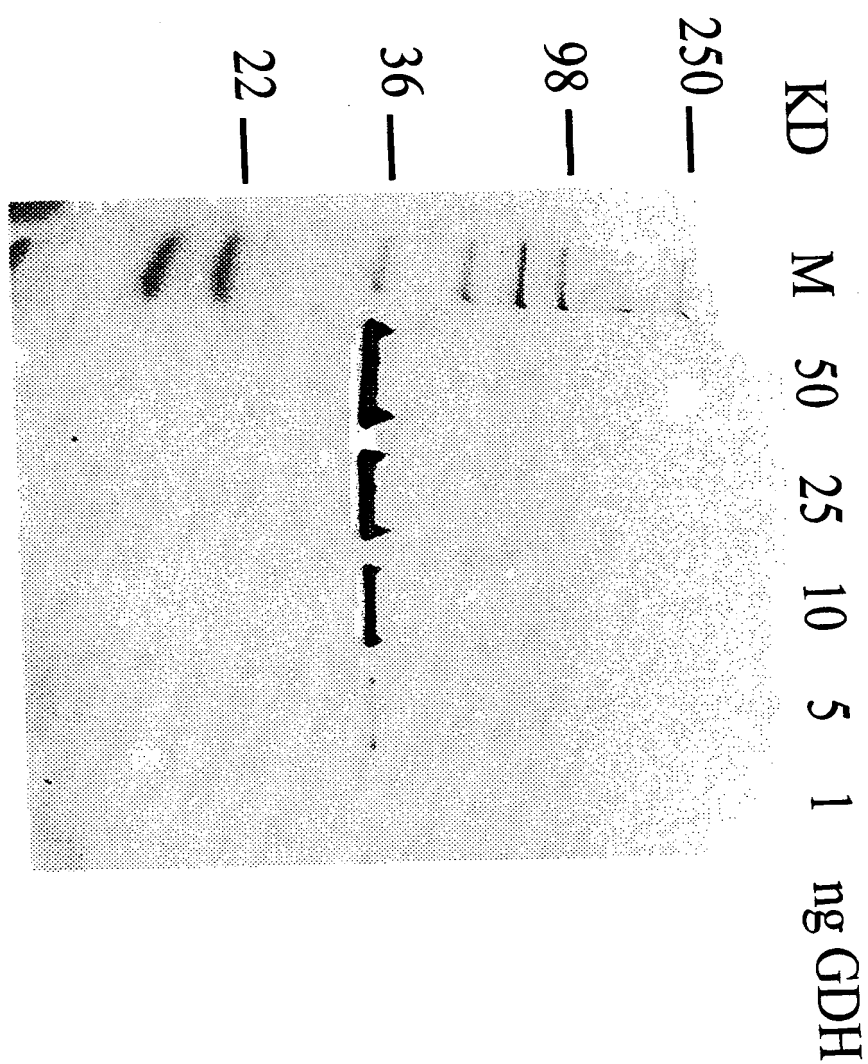
Fig. 8





9/9

Fig. 9



SEQUENZPROTOKOLL

Merck Patent GmbH

5

<120> Glucose-Dehydrogenase-Fusionsproteine und ihre
Verwendung in Expressionssystemen

<130> 9906920-Bz-mi

10

<140>

<141>

<160> 16

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3992

20

<212> DNA

<213> Bacillus megaterium

<220>

<221> CDS

25

<222> (186)..(968)

<223> Glucose-Deghydrogenase aus Bacillus megaterium

<220>

<221> CDS

30

<222> (978)..(1010)

<223> Poly-Histidintag

<220>

<221> gene

35

<222> (1)..(3992)

<223> Plasmid PAW2

<400> 1

40

ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt 60

tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaaat gaatagttcg acaaaaaatct 120

agataacgag ggcaatcgat gaattcgagc tcggtaccgc gggatccctc gaggtcgacc 180

45

tgcag atg tat aca gat tta aaa gat aaa gta gtt gta att aca ggt gga 230

Met Tyr Thr Asp Leu Lys Asp Lys Val Val Val Ile Thr Gly Gly

1

5

10

15

tca aca ggt tta gga cgc gca atg gct gtt cgt ttc ggt caa gaa gaa 278

50

Ser Thr Gly Leu Gly Arg Ala Met Ala Val Arg Phe Gly Gln Glu Glu

20

25

30

gca aaa gtt gtt att aac tat tac aac aat gaa gaa gaa gct cta gat 326

55

Ala Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Asn Asn Glu Glu Glu Ala Leu Asp

35

40

45

gcg aaa aaa gaa gta gaa gaa gca ggc gga caa gca atc atc gtt caa 374

Ala Lys Lys Glu Val Glu Glu Ala Gly Gly Gln Ala Ile Ile Val Gln

50

55

60

60



	ggc	gat	gta	aca	aaa	gaa	gaa	gac	ggt	gta	aat	ctt	ggt	caa	aca	gct	422
5	Gly	Asp	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Val	Gln	Thr	Ala	
	65						70					75					
	att	aaa	gaa	ttt	ggt	aca	tta	gac	gta	atg	att	aac	aac	gct	ggt	gtt	470
	Ile	Lys	Glu	Phe	Gly	Thr	Leu	Asp	Val	Met	Ile	Asn	Asn	Ala	Gly	Val	
	80					85					90					95	
10																	
	gaa	aac	cca	ggt	cct	tct	cat	gag	cta	tct	cta	gat	aac	tgg	aac	aaa	518
	Glu	Asn	Pro	Val	Pro	Ser	His	Glu	Leu	Ser	Leu	Asp	Asn	Trp	Asn	Lys	
					100					105					110		
15	ggt	att	gat	aca	aac	tta	aca	ggt	gca	ttc	tta	gga	agc	cgt	gaa	gca	566
	Val	Ile	Asp	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Ala	Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	
				115					120					125			
20	att	aaa	tac	ttc	ggt	gaa	aac	gac	att	aaa	gga	aat	ggt	atc	aac	atg	614
	Ile	Lys	Tyr	Phe	Val	Glu	Asn	Asp	Ile	Lys	Gly	Asn	Val	Ile	Asn	Met	
			130					135					140				
	tct	agc	ggt	cac	gaa	atg	att	cct	tgg	cca	tta	ttt	ggt	cac	tac	gca	662
25	Ser	Ser	Val	His	Glu	Met	Ile	Pro	Trp	Pro	Leu	Phe	Val	His	Tyr	Ala	
		145					150					155					
	gca	agt	aaa	ggc	ggt	atg	aaa	cta	atg	acg	gaa	aca	ttg	gct	ctt	gaa	710
30	Ala	Ser	Lys	Gly	Gly	Met	Lys	Leu	Met	Thr	Glu	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	
	160					165					170					175	
	tat	gcg	cca	aaa	ggt	atc	cgc	gta	aat	aat	att	gga	cca	ggt	gcg	atg	758
	Tyr	Ala	Pro	Lys	Gly	Ile	Arg	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Pro	Gly	Ala	Met	
					180					185					190		
35	aac	aca	cca	att	aac	gca	gag	aaa	ttt	gca	gat	cca	gaa	caa	cgt	gca	806
	Asn	Thr	Pro	Ile	Asn	Ala	Glu	Lys	Phe	Ala	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Ala	
				195					200					205			
40	gac	gta	gaa	agc	atg	att	cca	atg	ggt	tac	atc	ggt	aaa	cca	gaa	gaa	854
	Asp	Val	Glu	Ser	Met	Ile	Pro	Met	Gly	Tyr	Ile	Gly	Lys	Pro	Glu	Glu	
			210					215					220				
	gta	gca	gca	ggt	gca	gca	ttc	tta	gct	tca	tca	caa	gca	agc	tat	gta	902
45	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Al											

gccagcgccc tagcgccgcg tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc 1230
5 ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta 1290
cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtagtgg gccatcgccc 1350
tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg 1410
10 ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt 1470
ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat 1530
15 ttttaaaaaa tattaacgct tacaatttca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga 1590
accctatttt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 1650
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 1710
20 gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca ccagaaaacg 1770
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 1830
gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 1890
25 agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 1950
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 2010
30 gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgcctgc cataaccatg 2070
agtataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc 2130
35 gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcggtggga accggagctg 2190
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 2250
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attgatagac 2310
40 tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 2370
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtggctctc gcggtatcat tgcagcactg 2430
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 2490
45 atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtag 2550
gaattaatga tgtctcgttt agataaaaagt aaagtgatta acagcgcatt agagctgctt 2610
50 aatgaggtcg gaatcgaagg tttaacaacc cgtaaaactcg cccagaagct aggtgtagag 2670
cagcctacat tgtattggca tgtaaaaaat aagcgggctt tgctcgacgc cttagccatt 2730
gagatgttag ataggcacca tactcacttt tgcccttttag aaggggaaag ctggcaagat 2790
55 tttttacgta ataacgctaa aagttttaga tgtgctttac taagtcacgc cgatggagca 2850
aaagtacatt taggtacacg gcctacagaa aaacagtatg aaactctcga aaatcaatta 2910
60 gcctttttat gccacaaggg tttttcacta gagaatgcat tatatgcaact cagcgcagtg 2970

gggcatttta ctttaggttg cgtattggaa gatcaagagc atcaagtcgc taaagaagaa 3030
 agggaaacac ctactactga tagtatgccg ccattattac gacaagctat cgaattat 3090
 5 gatcaccaag gtgcagagcc agccttctta ttcggccttg aattgatcat atgcggatta 3150
 gaaaaacaac ttaaagtga aagtgggtct taaaagcagc ataacctttt tccgtgatgg 3210
 taacttcact agtttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa 3270
 10 atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3330
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 3390
 15 ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 3450
 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 3510
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatect gttaccagt 3570
 20 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg 3630
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 3690
 25 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 3750
 gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3810
 agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3870
 30 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3930
 agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgacccga 3990
 35 ca 3992

<210> 2
 <211> 272
 40 <212> PRT
 <213> Bacillus megaterium (GlcDH-Polytag-Fusions-Protein)
 <400> 2
 45 Met Tyr Thr Asp Leu Lys Asp Lys Val Val Val Ile Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Thr Gly Leu Gly Arg Ala Met Ala Val Arg Phe Gly Gln Glu Glu Ala
 20 25 30
 50 Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Asn Asn Glu Glu Glu Ala Leu Asp Ala
 35 40 45
 Lys Lys Glu Val Glu Glu Ala Gly Gly Gln Ala Ile Ile Val Gln Gly
 50 55 60
 55 Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Val Asn Leu Val Gln Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 60 Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Val Met Ile Asn Asn Ala Gly Val Glu
 85 90 95

Asn Pro Val Pro Ser His Glu Leu Ser Leu Asp Asn Trp Asn Lys Val
 100 105 110
 5 Ile Asp Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
 115 120 125
 Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
 10 130 135 140
 Ser Val His Glu Met Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
 145 150 155 160
 15 Ser Lys Gly Gly Met Lys Leu Met Thr Glu Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
 165 170 175
 Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Met Asn
 180 185 190
 20 Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Glu Gln Arg Ala Asp
 195 200 205
 Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Lys Pro Glu Glu Val
 25 210 215 220
 Ala Ala Val Ala Ala Phe Leu Ala Ser Ser Gln Ala Ser Tyr Val Thr
 225 230 235 240
 30 Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Lys Tyr Pro Ser Phe
 245 250 255
 Gln Ala Gly Arg Gly Ala Met Arg Gly Ser His His His His His His
 260 265 270
 35
 <210> 3
 <211> 4193
 <212> DNA
 40 <213> Bacillus megaterium + Heamenteria ghilianii Fusions-Gen
 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(4193)
 45 <223> Plasmid PAW4
 <220>
 <221> CDS
 <222> (141)..(344)
 50 <223> Tridegin
 <220>
 <221> CDS
 <222> (387)..(1169)
 55 <223> Glucose-Dehydrogenase
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1179)..(1211)
 60 <223> Poly-Histidintag



<400> 3
ccatcgaatg gccagatgat taattcctaa tttttgttga cactctatca ttgatagagt 60

5 tattttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaat gaatagttcg acaaaaatct 120

agataacgag ggcaatcgat atg aaa cta ttg cct tgc aaa gaa tgg cat caa 173
Met Lys Leu Leu Pro Cys Lys Glu Trp His Gln
1 5 10

10 ggt att cct aac cct agg tgc tgg tgt ggg gct gat cta gaa tgc gca 221
Gly Ile Pro Asn Pro Arg Cys Trp Cys Gly Ala Asp Leu Glu Cys Ala
15 20 25

15 caa gac caa tac tgt gcc ttc ata cct caa tgt aga cca aga tca gaa 269
Gln Asp Gln Tyr Cys Ala Phe Ile Pro Gln Cys Arg Pro Arg Ser Glu
30 35 40

ctg att aaa cct atg gat gat ata tac caa aga cca gtc gag ttt cca 317
20 Leu Ile Lys Pro Met Asp Asp Ile Tyr Gln Arg Pro Val Glu Phe Pro
45 50 55

aac ctt cca tta aaa cct agg gag gaa agcgctatga gaggatcgca 364
25 Asn Leu Pro Leu Lys Pro Arg Glu Glu
60 65

tcaccatcac catcacctgc ag atg tat aca gat tta aaa gat aaa gta gtt 416
Met Tyr Thr Asp Leu Lys Asp Lys Val Val
70 75

30 gta att aca ggt gga tca aca ggt tta gga cgc gca atg gct gtt cgt 464
Val Ile Thr Gly Gly Ser Thr Gly Leu Gly Arg Ala Met Ala Val Arg
80 85 90

35 ttc ggt caa gaa gaa gca aaa gtt gtt att aac tat tac aac aat gaa 512
Phe Gly Gln Glu Glu Ala Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Asn Asn Glu
95 100 105 110

gaa gaa gct cta gat gcg aaa aaa gaa gta gaa gaa gca ggc gga caa 560
40 Glu Glu Ala Leu Asp Ala Lys Lys Glu Val Glu Glu Ala Gly Gly Gln
115 120 125

gca atc atc gtt caa ggc gat gta aca aaa gaa gaa gac gtt gta aat 608
45 Ala Ile Ile Val Gln Gly Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Val Asn
130 135 140

ctt gtt caa aca gct att aaa gaa ttt ggt aca tta gac gta atg att 656
Leu Val Gln Thr Ala Ile Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Val Met Ile
145 150 155

50 aac aac gct ggt gtt gaa aac cca gtt cct tct cat gag cta tct cta 704
Asn Asn Ala Gly Val Glu Asn Pro Val Pro Ser His Glu Leu Ser Leu
160 165 170

gat aac tgg aac aaa gtt att gat aca aac tta aca ggt gca ttc tta 752
55 Asp Asn Trp Asn Lys Val Ile Asp Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu
175 180 185 190

gga agc cgt gaa gca att aaa tac ttc gtt gaa aac gac att aaa gga 800
60 Gly Ser Arg Glu Ala Ile Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly
195 200 205

aat gtt atc aac atg tct agc gtt cac gaa atg att cct tgg cca tta 848
 Asn Val Ile Asn Met Ser Ser Val His Glu Met Ile Pro Trp Pro Leu
 210 215 220
 5 ttt gtt cac tac gca gca agt aaa ggc ggt atg aaa cta atg acg gaa 896
 Phe Val His Tyr Ala Ala Ser Lys Gly Gly Met Lys Leu Met Thr Glu
 225 230 235
 10 aca ttg gct ctt gaa tat gcg cca aaa ggt att cgc gta aat aat att 944
 Thr Leu Ala Leu Glu Tyr Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile
 240 245 250
 15 gga cca ggt gcg atg aac aca cca att aac gca gag aaa ttt gca gat 992
 Gly Pro Gly Ala Met Asn Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp
 255 260 265 270
 20 cca gaa caa cgt gca gac gta gaa agc atg att cca atg ggt tac atc 1040
 Pro Glu Gln Arg Ala Asp Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile
 275 280 285
 ggt aaa cca gaa gaa gta gca gca gtt gca gca ttc tta gct tca tca 1088
 Gly Lys Pro Glu Glu Val Ala Ala Val Ala Ala Phe Leu Ala Ser Ser
 290 295 300
 25 caa gca agc tat gta aca ggt att aca tta ttt gca gat ggc ggt atg 1136
 Gln Ala Ser Tyr Val Thr Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met
 305 310 315
 30 acg aaa tac cct tct ttc caa gca gga aga ggc taatagagc gct atg aga 1187
 Thr Lys Tyr Pro Ser Phe Gln Ala Gly Arg Gly Ala Met Arg
 320 325 330
 35 gga tcg cat cac cat cac cat cac taatagaagc ttgacctgtg aagtgaataa 1241
 Gly Ser His His His His His His
 335 340
 tggcgacacat tgtgcgacat tttttttgtc tgccgtttac cgctactgcg tcacggatct 1301
 40 ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 1361
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgcg ttcttccctt cctttctcgc 1421
 45 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 1481
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtagtgg 1541
 gccatgcgcc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 1601
 50 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcgggtctatt cttttgattt 1661
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 1721
 55 taacgcgaat ttttaacaaa tattaacgct tacaatttca ggtggcactt ttcggggaaa 1781
 tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt cttaaatacat tcaaataatgt atccgctcat 1841
 gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 1901
 60 acatttccgt gtcgccttta ttcccttttt tgccgcattt tgccttccgt tttttgctca 1961

cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 2021
catcgaactg gatctcaaca gcggttaagat ccttgagagt ttctgccccg aagaacgttt 2081
5 tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc 2141
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 2201
accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctgc 2261
10 cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 2321
ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 2381
15 accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 2441
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 2501
attgatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc 2561
20 ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtggctctc gcggtatcat 2621
tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 2681
25 tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa 2741
gcattggtag gaattaatga tgtctcgttt agataaaagt aaagtgatta acagcgcatt 2801
agagctgctt aatgaggctg gaatcgaagg tttaacaacc cgtaaactcg cccagaagct 2861
30 aggtgtagag cagcctacat tgtattggca tgtaaaaaat aagcgggctt tgctcgacgc 2921
cttagccatt gagatgtag ataggcacca tactcacttt tgccctttag aaggggaaag 2981
35 ctggcaagat tttttacgta ataacgctaa aagttttaga tgtgctttac taagtcacgc 3041
cgatggagca aaagtacatt taggtacacg gcctacagaa aaacagtatg aaactctcga 3101
aaatcaatta gcctttttat gccacaagg tttttcacta gagaatgcat tatatgcact 3161
40 cagcgcagtg gggcatttta ctttaggttg cgtattggaa gatcaagagc atcaagtcgc 3221
taaagaagaa agggaaacac ctactactga tagtatgccg ccattattac gacaagctat 3281
45 cgaattatatt gatcaccaag gtgcagagcc agccttctta ttcggccttg aattgatcat 3341
atgcggatta gaaaaacaac ttaaatgtga aagtgggtct taaaagcagc ataacctttt 3401
tccgtgatgg taacttcact agttttaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct 3461
50 catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 3521
gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa 3581
55 aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctacca ctctttttcc 3641
gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta 3701
gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct 3761
60 gttaccagtg gctgctgccg gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg 3821

atagttaccg gataaggcgc agcgggtcggg ctgaacgggg gggttcgtgca cacagcccag 3881
 cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 3941
 5 cacgcttccc gaagggagaaa aggcgggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg 4001
 agagcgcacg agggagcttc caggggggaaa cgcctgggtat ctttatagtc ctgtcggggtt 4061
 10 tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 4121
 gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgctca 4181
 catgacccga ca 4193
 15

<210> 4

<211> 340

<212> PRT

20 <213> Bacillus megaterium + Heamenteria ghilianii Fusions-Protein

<400> 4

Met Lys Leu Leu Pro Cys Lys Glu Trp His Gln Gly Ile Pro Asn Pro
 1 5 10 15
 25 Arg Cys Trp Cys Gly Ala Asp Leu Glu Cys Ala Gln Asp Gln Tyr Cys
 20 25 30
 30 Ala Phe Ile Pro Gln Cys Arg Pro Arg Ser Glu Leu Ile Lys Pro Met
 35 40 45
 Asp Asp Ile Tyr Gln Arg Pro Val Glu Phe Pro Asn Leu Pro Leu Lys
 50 55 60
 35 Pro Arg Glu Glu Met Tyr Thr Asp Leu Lys Asp Lys Val Val
 65 70 75
 Val Ile Thr Gly Gly Ser Thr Gly Leu Gly Arg Ala Met Ala Val Arg
 80 85 90
 40 Phe Gly Gln Glu Glu Ala Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Asn Asn Glu
 95 100 105 110
 Glu Glu Ala Leu Asp Ala Lys Lys Glu Val Glu Glu Ala Gly Gly Gln
 45 115 120 125
 Ala Ile Ile Val Gln Gly Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Val Asn
 130 135 140
 50 Leu Val Gln Thr Ala Ile Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Val Met Ile
 145 150 155
 Asn Asn Ala Gly Val Glu Asn Pro Val Pro Ser His Glu Leu Ser Leu
 160 165 170
 55 Asp Asn Trp Asn Lys Val Ile Asp Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu
 175 180 185 190
 Gly Ser Arg Glu Ala Ile Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly
 60 195 200 205



10

Asn Val Ile Asn Met Ser Ser Val His Glu Met Ile Pro Trp Pro Leu
 210 215 220

5 Phe Val His Tyr Ala Ala Ser Lys Gly Gly Met Lys Leu Met Thr Glu
 225 230 235

Thr Leu Ala Leu Glu Tyr Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile
 240 245 250

10 Gly Pro Gly Ala Met Asn Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp
 255 260 265 270

15 Pro Glu Gln Arg Ala Asp Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile
 275 280 285

Gly Lys Pro Glu Glu Val Ala Ala Val Ala Ala Phe Leu Ala Ser Ser
 290 295 300

20 Gln Ala Ser Tyr Val Thr Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met
 305 310 315

Thr Lys Tyr Pro Ser Phe Gln Ala Gly Arg Gly Ala Met Arg Gly Ser
 320 325 330

25 His His His His His His
 335 340

30

<210> 5
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

35

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(32)
 <223> Primer 1, GlcDH

40

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 5

45 ggcgcgaattc atgtatacag atttaaaaag at

32

<210> 6
 <211> 31
 <212> DNA

50 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(31)
 <223> Primer 2, GlcDH

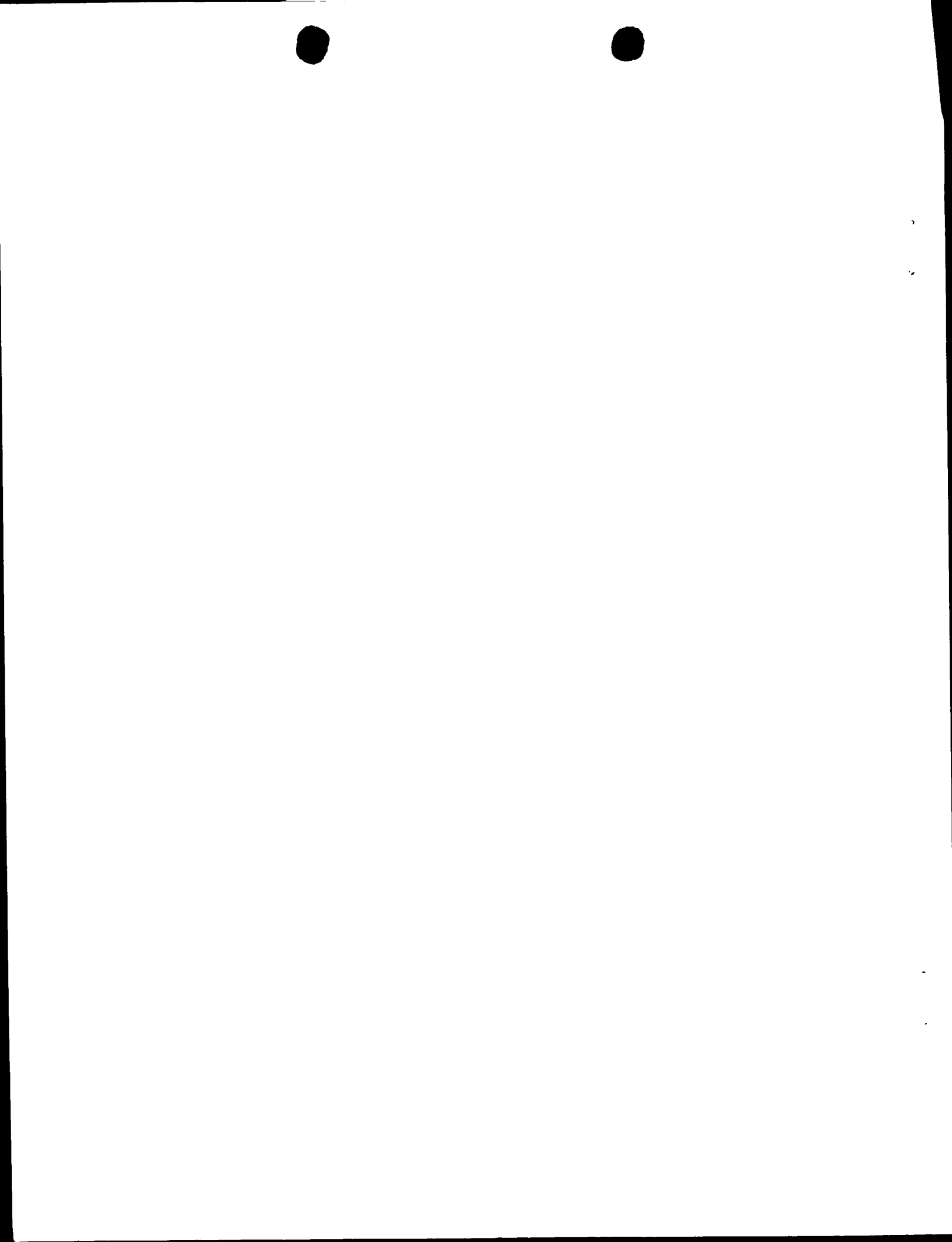
55

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

60 <400> 6

gcgcttcgaa ctattagcct cttcctgctt g

31



<210> 7
<211> 31
<212> DNA
5 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

10 <400> 7
gcgcctgcag atgtatacag atttaaaaga t 31

<210> 8
15 <211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
20 <221> primer_bind
<222> (1)..(31)
<223> Primer 4, GlcDH

<220>
25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 8
gcgcagcgct ctattagcct cttcctgctt g 31

30
<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(31)
<223> Primer 5, Tridegin

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 9
45 gcgcacgat atgaaactat tgccttgcaa a 31

<210> 10
<211> 31
50 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
55 <222> (1)..(31)
<223> Primer 6, Tridegin

<220>
60 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

12.

<400> 10
gcgcctgcag gtgatgggtga tggatgatgcg a 31

5 <210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(22)
<223> Primer 7, pASK 75UPN

15 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 11
ccatcgaatg gccagatgat ta 22

20

<210> 12
<211> 21
<212> DNA

25 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(21)

30 <223> pASK 75 RPN

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

35 <400> 12
tagcggtaaa cggcagacaa a 21

<210> 13

40 <211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

45 <221> primer_bind
<222> (1)..(20)
<223> Primer 9, T7 Seq.

<220>

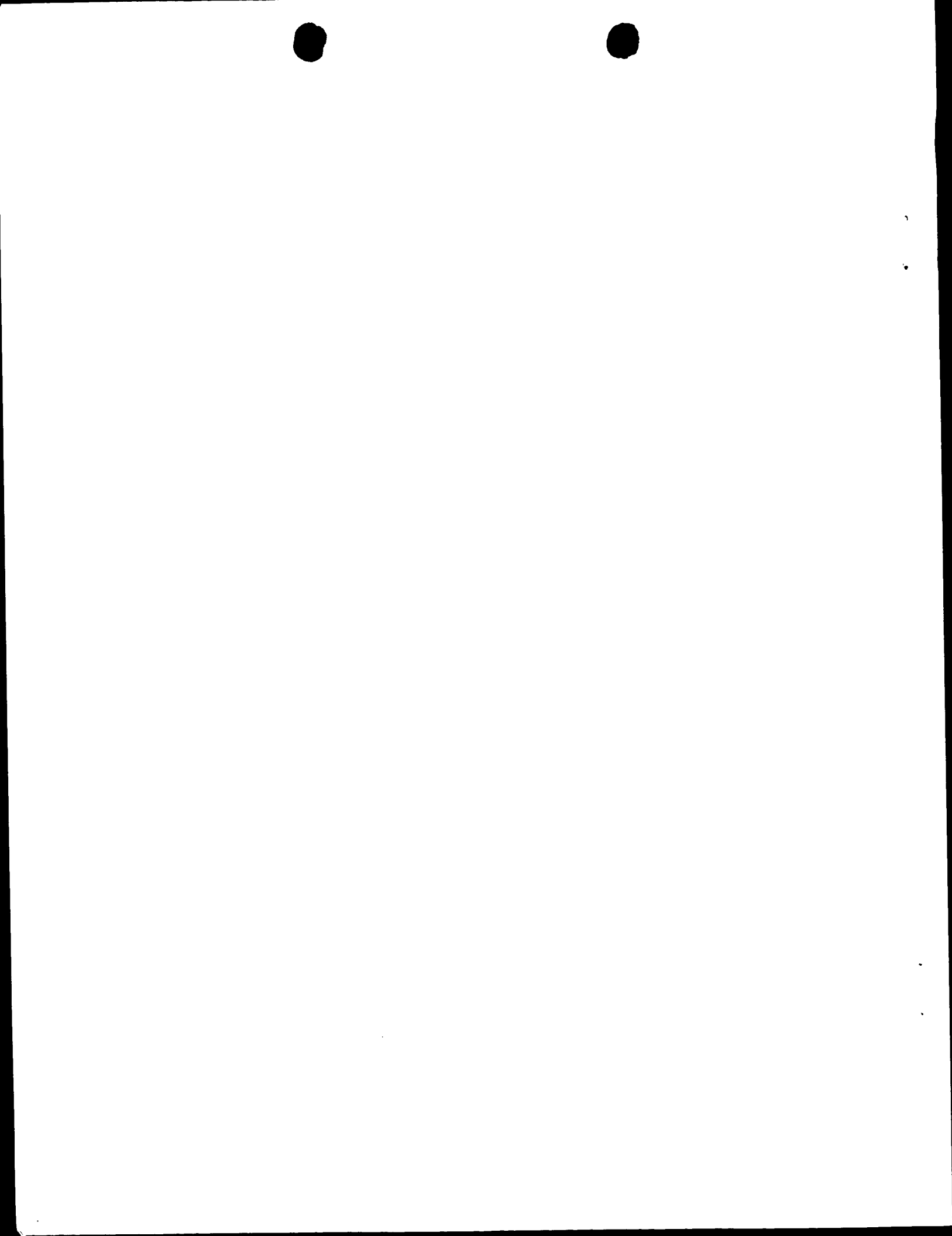
50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 13
taatacgact cactataggg 20

55

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

60 <220>

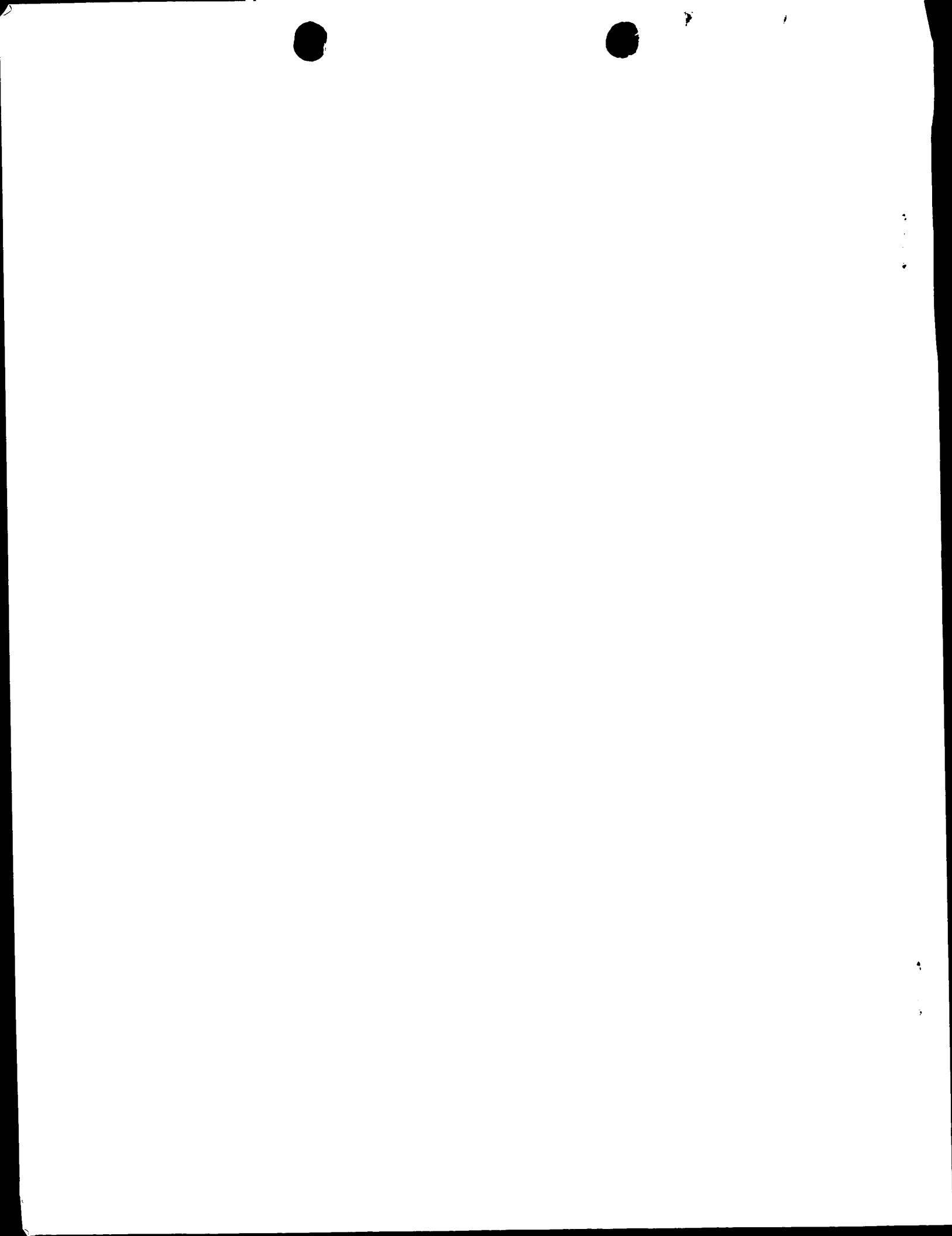


<221> primer_bind
<222> (1)..(18)
<223> Rev. Seq.

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 14
tagaaggcac agtcgagg
10

18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00978

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0290768	B	17-11-1988	DE 3711881 A	27-10-1988
			DE 3887197 D	03-03-1994
			EP 0290768 A	17-11-1988
			ES 2061536 T	16-12-1994
			JP 2729628 B	18-03-1998
			JP 63269979 A	08-11-1988
			US 5126256 A	30-06-1992
			US 5250415 A	05-10-1993
WO 9835025	A	13-08-1998	AU 4032997 A	26-08-1998
			EP 0967271 A	29-12-1999
JP 63230098	A	26-09-1988	NONE	
EP 0967271	A	29-12-1999	AU 4032997 A	26-08-1998
			WO 9835025 A	13-08-1998

